



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

**JOÃO LUIZ QUIRINO DA SILVA FILHO**

**AVALIAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO E SUPEREXPRESSION DO GENE C-MYC  
EM SUBTIPOS MOLECULARES DE CARCINOMA DUCTAL INVASIVO**

**Recife**

**2016**

**JOÃO LUIZ QUIRINO DA SILVA FILHO**

**AVALIAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO E SUPEREXPRESSION DO GENE C-MYC  
EM SUBTIPOS MOLECULARES DE CARCINOMA DUCTAL INVASIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Inovação Terapêutica.

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**

**Recife  
2016**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva Filho, João Luiz Quirino da

Avaliação da amplificação e superexpressão do gene C-MYC em subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo / João Luiz Quirino da Silva Filho. – Recife: O Autor, 2016.

98 f.: il.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Mamas – Câncer 2. Genética médica I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orient.) II. Título.

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-056

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: João Luiz Quirino da Silva Filho

Título: **AVALIAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO E SUPEREXPRESSION DO GENE C-MYC EM SUBTIPOS MOLECULARES DE CARCINOMA DUCTAL INVASIVO.**

Tese apresentada Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 30/03/2016

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Depto. de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Carina Scanoni Maia

Depto. de Histologia e Embriologia – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior

Depto. de Patologia – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Depto. de Histologia e Embriologia – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dr. Igor Teixeira Cavalcanti

Laboratório de Imunopatologia Kaizo Azami - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITORA**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Eduarda de Larrazábal

**VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Luiz Alberto Lira Soares

*A minha filha Clarice Quirino Cândido de Sá Soares, a minha mãe, Edna Botelho do Nascimento, a minha avó materna, Maria das Dores do Nascimento e aos meus avós paternos Maria Ângela Quirino da Silva e Lafaiete Quirino da Silva por todo amor, ensinamentos e apoio, sem os quais não chegaria a lugar algum.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, o nosso Pai, fonte da mais infinda sabedoria, força, amor e esperança. Tão necessárias para manter nossa força vital. Obrigado por nos permitir o dom vida.

À minha Mãe, **Edna Botelho do Nascimento**, por todo apoio e ensinamentos e pelo exemplo de mãe, mulher, amiga e ser humano. Ensinando-me sempre a perseverar e ter humildade acima de tudo.

Aos meus avós **Maria das Dores do Nascimento, Ângela Quirino da Silva** e **Lafaiete Quirino da Silva** pelo exemplo de luta e trabalho, ensinamentos, conselhos, carinho e amor dedicado.

Aos meus irmãos **Érica Regina da Silva, Érick Luiz do Nascimento** e **Esdras Luiz Quirino da Silva** pelo amor que nos une, pelo carinho e certeza de que sempre estaremos unidos em prol do bem da nossa família. Seriei sempre imensamente grato pelo apoio e compreensão de você. Desculpem pelos momentos bons e não compartilhados pelos quais tivemos que nos privar. Sei que estão muito orgulhosos por essa nossa conquista.

Ao meu tio **João Batista Botelho do Nascimento** por toda ajuda, companheirismo e amizade. Sempre ao meu lado acreditando e torcendo pelas minhas vitórias. Ao senhor meu tio todo amor e gratidão.

A minha tia **Elisângela Quirino da Silva** por toda ajuda, dedicação, amizade e companheirismo. Sempre ao meu lado acreditando e torcendo pelas minhas vitórias. A senhora todo amor e gratidão.

A **Clara Cândido de Sá Soares**, por ter concedido a maior riqueza que pude ter em minha vida: minha amada filha **Clarice**.

Aos meus lindos e maravilhosos sobrinhos **Osíris Calede, Guilherme Nascimento e Mirian Quirino**. Titio os ama muito.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**, pela confiança depositada, pelo apoio, paciência, dedicação, pelos momentos preciosos de aprendizagem e principalmente pelo exemplo de humildade e humanidade para com os seus alunos. Raras são as pessoas com tal sensibilidade e presteza no cuidado ao aluno. Enxergando e compreendendo suas limitações e anseios. **A você Eduardo, muito obrigado!**

À **Profa. Luciana Tavares**, pela amizade, pelos momentos maravilhosos de aprendizado, por ter acreditado e dado suporte para o meu desenvolvimento acadêmico, pela confiança, pelo exemplo de humildade e sabedoria. Pelo incentivo durante o período de graduação e monitoria, etapa essencial para que esse momento se concretizasse. Uma vez li em algum lugar que ensinar é uma maneira de se manter imortal. Pois bem, Luciana, você com certeza é uma imortal. Pois plantou várias sementes que germinaram nos campos do saber. Toda vez que alguém perguntar de que árvore do conhecimento eu fui gerado SEMPRE terei a honra em dizer foi por você. Direi e digo que você foi minha professora, acreditou em mim até mesmo quando achava que não seria possível. Pegou na minha mão e me guiou pela estrada do conhecimento. **A você Lú, muito obrigado!**

À **Profa. Edileine Delallibera**, pelo apoio, confiança, por ter acreditado e dado suporte para o meu desenvolvimento acadêmico. Com certeza você deve estar muito orgulhosa por essa conquista. Saiba que muito do que eu farei e fizer SEMPRE haverá muito de seus ensinamentos. Você é um exemplo de humildade e sabedoria. Todo agradecimento não seria suficiente para expressar

a minha felicidade de ter te conhecido. Obrigado pela sensibilidade, pelo carinho nas atitudes, obrigado por acreditar em meu trabalho como aluno. Obrigado pelo destino ter colocado você em minha vida. Obrigado pelo incentivo durante o período de graduação, etapa essencial para que esse momento se realizasse. Sempre terei orgulho em dizer o que você é uma das responsáveis pelo meu caminho na vida acadêmica. **A você Edileine, muito obrigado!**

Aos amigos do Setor de Patologia do LIKA: **Juliana Vasconcelos (Jú Lí), Carmelita Cavalcanti (Carmel), Marina Cartaxo, Juliana Brandão, Steffany Ferreira (Stê), Bruno Trajano (Brunão), Jessica Catarina e Igor Teixeira** por tornar nosso ambiente de trabalho salutar e harmonioso.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**, pela oportunidade de convívio e aprendizagem.

Ao secretário do PPGIT, **Paulo**, as secretárias do LIKA, **Ilma, Conceição e Paulina**, pelo apoio e assistência oferecida em todos os momentos.

Ao **REUNI, FACEPE e CNPQ** pelo suporte financeiro.

***“Sendo eu um aprendiz a vida já me ensinou.  
Que besta é quem vive triste lembrando do que faltou.  
Magoando a cicatriz esquece de ser feliz por tudo que conquistou.  
Afinal, nem toda lágrima é dor.  
Nem toda graça é sorriso.  
Nem toda curva da vida tem uma placa de aviso.  
Nem sempre que você perde é de fato prejuízo.  
O meu ou seu caminho não são muito diferentes: tem espinho, pedra,  
buraco “pra mó” de atrasar a gente.  
Não desanime por nada!  
Pois até uma topada leva você “pra” frente!  
Só eu sei cada passo por mim dado nessa estrada esburacada que é a  
vida.  
Passei coisas que até mesmo Deus duvida.  
Eu fiquei triste, capiongo, aperreado.  
Porém, nunca me senti desmotivado.  
Me agarrava sempre numa mão amiga.  
Pedi forças!  
Minha alma era munida.  
Pois do céu a voz de Deus dizia assim: suba os queixo!  
Meta os pés!  
Confie em mim!  
Vá “pra” luta que eu cuido das feridas”***

***Bráulio Bessa***

## RESUMO

SILVA-FILHO, J.L.Q. **Avaliação da amplificação e superexpressão do gene *c-myc* em subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo.** 2016. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, correspondendo a 25% de todos os cânceres do sexo feminino. No Brasil, representa a primeira incidência de neoplasia na mulher. O gene *c-myc* codifica fatores de transcrição que participam, direta e indiretamente, da regulação do ciclo celular, diferenciação, metabolismo, crescimento, apoptose, instabilidade genômica, angiogênese e imortalização celulares. O *c-myc* tem sido apontado como peça central no processo tumorigênico e sua amplificação está relacionada com carcinomas invasivos que apresentam comportamento clínico mais agressivo e prognóstico reservado. Diante disto, o presente estudo objetivou investigar a relação da amplificação do gene *c-myc* com fatores prognósticos entre os subtipos moleculares de câncer de mama diagnosticado com carcinoma ductal invasivo (CDI). As amostras de CDI (n=60), fixadas em formalina e embebidas em parafina, foram obtidas no Arquivo de Biópsias do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A caracterização dos tumores em subtipos moleculares foi realizada utilizando imunohistoquímica para receptor de fator de crescimento epidérmico do tipo 2 (HER-2), receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) e o fator de proliferação celular (Ki-67). A detecção da amplificação do gene *c-myc* foi realizada através de Hibridização *in situ* cromógena (CISH). Os resultados mostraram maiores frequências para os subtipos Luminal A (37,7%) e Triplo-Negativo (40%). Neste estudo tumores Luminais, notadamente Luminal A, apresentaram correlação estatística quanto ao nível de diferenciação ( $p=0,0135$ ), tamanho menor ( $p=0,5715$ ), em estágio inicial no momento do diagnóstico; e com baixo a médio grau histológico e nuclear ao diagnóstico, respectivamente. Tumores dos subtipos superexpressão de HER-2 e Triplo-Negativo se relacionaram com características prognósticas desfavoráveis, apresentando maiores taxas de invasão linfonodal, maiores chances de tumores indiferenciados e predomínio de diagnóstico entre as pacientes mais jovens, respectivamente. A maior frequência de amplificação do *c-myc* foi observada em 21 tumores (35%) no subtipo Triplo-Negativo, indicando que a amplificação pode estar associada a tumores mais agressivos e por isso um prognóstico reservado.

**Palavras-chave:** Câncer de Mama. *c-myc*. Subtipos Moleculares. Amplificação Gênica. Hibridização *in situ* Cromógena.

## ABSTRACT

SILVA-FILHO, J.L.Q. **Assessment of amplification and overexpression of *c-myc* gene in molecular subtypes of invasive ductal carcinoma.** 2016. Tese (Doctor) Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

Breast cancer is the second most common cancer type worldwide and the most common among women, accounting for 25% of all female cancers. In Brazil, it represents the most incident cancer type in women. *C-myc* gene encodes transcription factors which are, directly and indirectly, involved in cell cycle regulation, differentiation, metabolism, growth, apoptosis, genomic instability, angiogenesis and cell immortalization. It has been considered as playing a role in tumorigenesis and its amplification is associated with more aggressive clinical behavior and poor prognosis in invasive carcinomas. This study aimed to investigate the relationship of *c-myc* amplification and clinicopathologic features among the subtypes of invasive ductal carcinomas (IDC) of breast. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissues samples (n=60) were retrieved from the Biopsies Archives of Anatomy and Pathology Sector of University Hospital at Federal University of Pernambuco. Tumors subtyping was developed using immunohistochemistry against epidermal growth factor receptor type 2 (HER-2), estrogen and progesterone receptors (ER and PR) and cell proliferating factor Ki-67. *c-myc* amplification was evaluated via chromogenic *in situ* hybridization (CISH). Results showed that the most frequent breast carcinomas subtypes were Luminal A (37.7%) and Triple-Negative (40%). Luminal tumors, mainly subtype A, showed to be well differentiated tumours regarding histological grade ( $p=0.0135$ ), of small size ( $p=0.5715$ ) at an early stage and presented a low and medium histologic and nuclear grade, respectively, at the time of diagnosis. Triple-Negative and HER-2 superexpression carcinomas were larger tumours, poorly differentiated ( $p=0.0570$ ), presenting higher rates of ganglionic involvement, advanced stages tumors and younger patients at the time of diagnosis, presenting the worst prognosis. We observed *c-myc* amplification in 21 tumours (35%) but no statistical difference was found between amplified and nonamplified and molecular subtypes of breast cancer.

**Key Words:** Breast Cancer. *c-myc*. Molecular Subtypes. Gene Amplification. Chromogenic *in situ* Hybridization.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração das seis características das células cancerígenas. 22
- Figura 2.** Corte histológico de um CDI, onde se observa células tumorais em um padrão de cordões sólidos (setas pretas) em meio ao tecido fibroso denso adjacente. Coloração H.E. 23
- Figura 3.** Processos celulares controlados pela MYC em condições normais e durante carcinogênese. 35
- Figura 4.** Regiões da proteína myc. 36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Anticorpos primários utilizados nas realizações de imunohistoquímica para caracterização molecular dos espécimes tumorais.	40
<b>Tabela 02:</b> Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunoistoquímica dos tumores de mama.	42
<b>Tabela 03:</b> Sondas utilizadas na realização da hibridização in situ Cromógena nos espécimes do estudo.	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>bHLHzip</b>	- Basic/helix-loop-helix/leucina zipper
<b>CDI</b>	- Carcinoma duactal invasivo
<b>CDIS</b>	- Carcinoma ductal <i>in situ</i>
<b>CISH</b>	- Hibridização <i>in situ</i> cromógena
<b>CK</b>	- Citoqueratina
<b>CLI</b>	- Carcinoma lobular invasivo
<b>c-myc</b>	- Gene de mielocitomatose celular
<b>CTD</b>	- Domínio Carboxila-terminal
<b>DMs</b>	- Cromossomos (corpúsculos) duplo-minúsculos
<b>DNA</b>	- Ácido desoxirribonucleico
<b>EGFR</b>	- Fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>epidermal growth fator</i> )
<b>FISH</b>	- Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
<b>HER-2</b>	- Receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (do inglês <i>human epidermal growth fator receptor type 2</i> )
<b>Her-2</b>	- Gene do receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (do inglês <i>human epidermal growth fator receptor type 2</i> )
<b>HSR</b>	- Região Homogênea de Coloração
<b>IHC</b>	- Imunohistoquímica
<b>INCA</b>	- Instituto Nacional do Câncer
<b>Ki-67</b>	- Antígeno de proliferação celular Ki-67
<b>L-myc</b>	- Gene de mielocitomatose de pulmão
<b>MB I-IV</b>	- Boxe myc I-IV
<b>MDR</b>	- Proteína associada à multirresistência a droga
<b>MYC</b>	- Gene de mielocitomatose celular
<b>N-myc</b>	- Gene de mielocitomatose em Neuroblastoma
<b>OMS</b>	- Organização Mundial da Saúde
<b>pRb</b>	- Proteína de retinoblastoma
<b>RE</b>	- Receptor de Estrógeno
<b>RNAm</b>	- Ácido ribonucleico mensageiro
<b>RP</b>	- Receptor de Progesterona
<b>TAD</b>	- Domínio de transativação
<b>UICC</b>	- União Internacional para Controle do Câncer
<b>WHO</b>	- Organização Mundial de Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2 OBJETIVOS</b>	19
2.2 Geral	19
2.3 Específicos	19
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	20
3.1 Câncer	20
3.2 Câncer de mama	22
3.3 Características morfológicas tumorais e marcadores moleculares	25
3.4 Subtipos moleculares de carcinoma invasivo da mama	31
3.5 Proto-oncogene <i>c-myc</i>	34
<b>4 METODOLOGIA</b>	39
4.1 Desenho do estudo	39
4.2 Amostras	39
4.3 Critérios de elegibilidade	39
4.4 Imunohistoquímica	40
4.5 Hibridização <i>in situ</i> cromogênica	42
4.6 Análise digital de imagem	43
4.7 Análise estatística	44
4.8 Aspectos éticos	44
<b>5 RESULTADOS</b>	45
5.1 ARTIGO 1: ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE C-MYC EM SUBTIPOS MOLECULARES DE CARCINOMA DA MAMA EMPREGANDO A TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU CROMÓGENA	45
5.2 ARTIGO 2: MOLECULAR SUBTYPES OF BREAST CANCER: STUDY OF C-MYC AMPLIFICATION AND EXPRESSION USING CHROMOGENIC IN SITU HYBRIDIZATION AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY METHOD	69
<b>6 CONCLUSÕES</b>	87
<b>REFERÊNCIAS</b>	88
<b>ANEXOS</b>	96

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama constitui um grupo heterogêneo de doenças, com diferentes formas de apresentação clínica, características morfológicas e resposta terapêutica (REIS-FILHO; TUTT, 2008; RAKHA; ELLIS, 2009; RAKHA et al., 2009, RAKHA; REIS-FILHO, 2009). Corresponde ao segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, representando 25% (AMERICAM CANCER SOCIETY, 2016; IARC, 2016). No Brasil, estimativas para o ano de 2016, indicam mais de 600.000 novos casos de câncer, dos quais 57.960 casos serão de câncer de mama (INCA, 2016).

O carcinoma ductal invasivo (CDI) corresponde a 75% dos cânceres no tecido mamário. Este câncer apresenta um comportamento clínico agressivo, que pode variar quanto aos parâmetros clínico-patológicos. Com frequência, o diagnóstico se dá em estágio avançado com presença de metástases (SCHULZ, 2007). No diagnóstico, o perfil radiográfico da mama, biópsia por agulhamento e perfil imunohistoquímico e histoquímico constituem as metodologias mais utilizadas (RUBIN et al., 2006). O tratamento pode ser mastectomia, linfadenectomia axilar, quimioterapia, radioterapia e terapia hormonal, sendo dois ou mais métodos frequentemente estão associados (RUBIN et al., 2006; SCHULZ, 2007, AMERICAM CANCER SOCIETY, 2016). A resposta terapêutica está ligada a vários biomarcadores (YASOJIMA et al., 2011).

A história natural das neoplasias malignas representa os eventos envolvidos na carcinogênese, crescimento, progressão e disseminação do tumor. A carcinogênese mamária se inicia com as alterações genéticas, representadas pela ativação de proto-oncogenes, como o *HER-2/c-erbB2/NEU*, *c-myc*, *ras*, dentre outros e com a perda de bloqueio de genes supressores (MENKE, 2007; CHAGAS, 2011).

O gene *c-myc*, localizado no braço longo do cromossomo 8 na região 24 (8q24) (MEYER; PENN, 2008) codifica fatores de transcrição envolvidos em diversos processos celulares como apoptose, progressão do ciclo celular, crescimento e divisão, metabolismo, adesão celular, motilidade, angiogênese e diferenciação (VITA; HENRIKSSON, 2006; MEYER; PENN, 2008) e sua desregulação pode induzir à carcinogênese da mama (WELM et al., 2005). Sua amplificação é relativamente comum no câncer de mama. A qual se caracteriza

pela presença de centenas de cópias do gene (BIZARI; SILVA; TAJARA, 2006). O *c-myc* tem sido mostrado amplificado e superexpresso em vários tipos de câncer. A frequência de sua amplificação, do mRNA e a superexpressão da proteína no câncer de mama variam entre 1%-94%, 22%-95% e 50%-100% respectivamente em diferentes estudos (LIAO; DICKSON, 2000). Podendo ser utilizados como um parâmetro de resposta à terapia (DEMING et al, 2000). Além disso, foi observado que este marcador pode ser útil para estratificar pacientes em grupos de risco mediante análise da amplificação do *c-myc* e de outros marcadores moleculares (ISMAIL et al., 2009). Outros estudos têm mostrado uma associação com tumores em estado avançado e com grande probabilidade de progressão e recidiva (BLANCATO et al., 2004).

O papel do *c-myc* na patogênese do câncer de mama não é bem compreendido (ZAJAC-KAYE, 2001). Em um estudo foi observado que o *c-myc* amplificado foi identificado como um dos fatores genéticos que adicionou significância prognóstica às variáveis clínicas, tal como tamanho do tumor, grau e estágio da doença (ISMAIL et al., 2009).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a amplificação e superexpressão do gene *c-myc* em subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Avaliar a amplificação e superexpressão do gene *c-myc* em subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo

### 2.2 Específicos

- Determinar a frequência de subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo da mama entre pacientes diagnosticadas com esse tumor;
- Investigar a relação entre parâmetros clínico-histopatológicos (idade, tamanho do tumor, presença de metástase e invasão linfonodal, grau histológico e nuclear e estadiamento patológico) para os subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo da mama;
- Determinar a frequência de amplificação do gene *c-myc* entre subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo da mama;
- Investigar a relação da amplificação do gene *c-myc* entre parâmetros clínico-histopatológicos (idade, tamanho do tumor, presença de metástase e invasão linfonodal, grau histológico e nuclear e estadiamento patológico) para os subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo da mama;
- Determinar a frequência de superexpressão do gene *c-myc* entre subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo da mama;
- Investigar a relação da de superexpressão do gene *c-myc* entre parâmetros clínico-histopatológicos (idade, tamanho do tumor, presença de metástase e invasão linfonodal, grau histológico e nuclear e estadiamento patológico) para os subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo da mama;
- Estudar a correlação da frequência desses biomarcadores moleculares com o comportamento clínico dos subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo;
- Avaliar o uso potencial destes biomarcadores na subclassificação e estratificação do grau de malignidade dos subtipos moleculares de tumores avaliados vislumbrando sua utilização clínica.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Câncer

O câncer, nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, onde células de uma determinada parte do organismo passam a apresentar um comportamento anômalo. Caracterizado pelo crescimento desordenado e a capacidade de invadir outros órgão e tecidos do corpo. Em geral, estas células são agressivas e apresentam altas taxas de proliferação, fazendo com as mesmas sejam extremamente agressivas. Essa agressividade é resultado do efeito deletério da invasão de outros órgãos próximos ou distantes do sítio de origem do tumor, fenômeno denominado de metástase (INCA 2016).

O surgimento e o aprimoramento de técnicas moleculares já existentes voltadas ao estudo do câncer avançou vertiginosamente nas últimas décadas mostrando ser uma morbidade que envolve alterações dinâmicas no genoma. Neste sentido, grupos e linhas de pesquisa de todo o mundo indicam que o processo carcinogênico em humanos envolve múltiplos estágios que refletem alterações genéticas, as quais direcionam o processo de transformação de um clone celular normal em uma célula neoplásica (HANAHAN; WEINBERG, 2000; 2011).

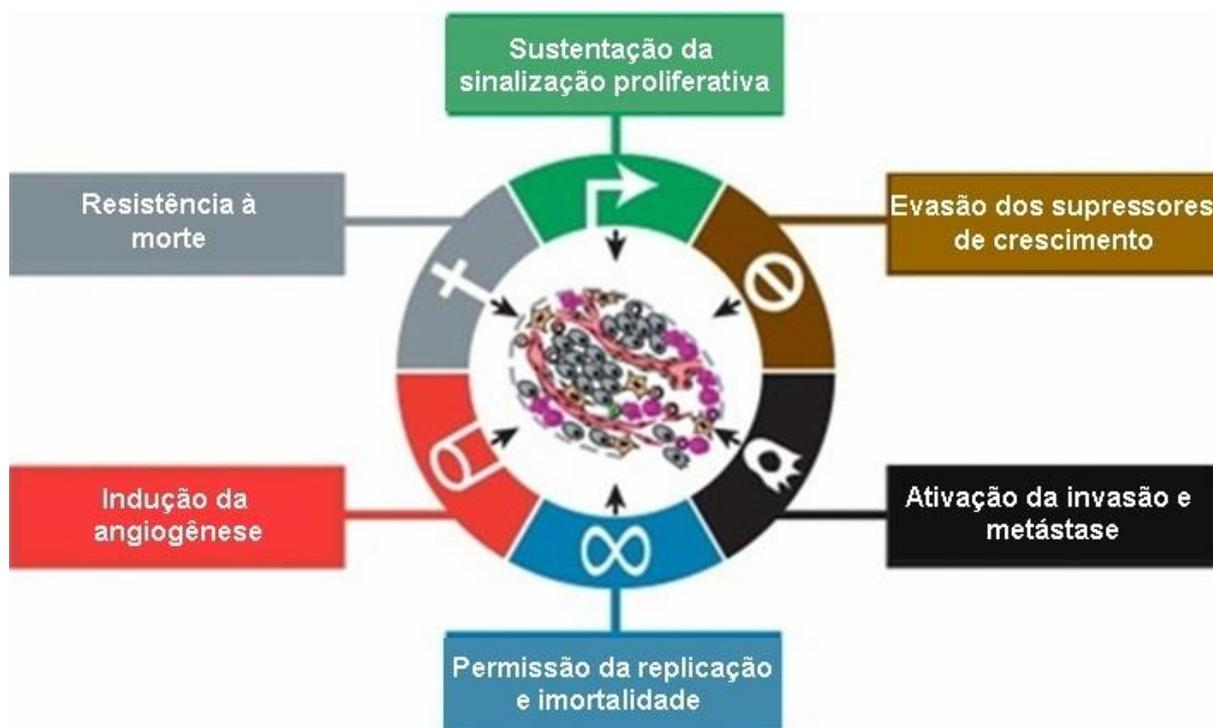
Conhecido há muitos séculos pela humanidade, durante muito tempo o câncer foi considerado como uma afecção de países desenvolvidos. Dada sua relação com o estilo de vida dos grandes centros urbanos. Porém, tem-se observado uma transição epidemiológica com relação neste cenário na atualidade. Há aproximadamente quatro décadas a maior parte dos gastos em câncer pôde ser observado em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos. Nesta perspectiva, o câncer ganhou uma dimensão bem maior, tornando-se um problema de saúde pública em todo mundo. Neste contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, espera-se uma incidência de 27 milhões de casos de câncer, 17 milhões de mortes anualmente e 75 milhões de pessoas com este mal (WHO, 2015). Dados da Sociedade de Câncer Americana (2014), informaram que seriam esperados mais de 1 milhão e 600 mil novos casos de câncer no EUA para o ano de 2014. E

para dimensionar a problemática, a este valor não foram incluídos os cânceres *in situ* (AMERICAM CANCER SOCIETY, 2014).

A carcinogênese, fenômeno de formação do câncer, inicia-se a partir de lesões ao DNA que podem levar a ativação de pró-oncogenes presentes em células normais. Esses genes desempenham um papel chave na proliferação, apoptose, diferenciação dentre outras funções extremamente relevantes para a conservação das funções normais das células. Neste contexto, têm-se observado que a superexpressão protéica, fruto de amplificação, pode determinar a progressão de alterações celulares, levando ao desenvolvimento de neoplasias (WOLFER et al., 2010).

Uma variedade de fatores, externos e/ou internos estão relacionados com a origem do câncer, como por exemplo, estilo de vida, consumo de álcool, sedentarismo, fumo, hábitos alimentares, sociais, culturais e outros. Por outro lado, há fatores cujas causas estão geneticamente pré-determinadas, como resultado de mutações e/ou desregulação em oncogenes que controlam apoptose e proliferação do ciclo celular. Neste cenário, a observação de genes supressores de tumor configura também destaque (SCHULZ, 2007). Com o passar do tempo da expansão clonal, mutações adicionais se instalam, conduzindo a heterogeneidade celular culminando na formação de uma neoplasia maligna (ROBBINS et al., 2009). Devido ao grande número de alterações genéticas várias funções das células neoplásicas encontram-se alteradas bem com suas respectivas vias, como por exemplo, moléculas de transdução para o crescimento, moléculas de adesão, fatores de transcrição dentre outros (FARIA; RABENHORST, 2005, SCHMITT, 2011).

O câncer apresenta uma grande heterogeneidade de alterações genéticas que refletem sua variabilidade de comportamento clínico. Contudo, células neoplásicas apresentam diversas características em comum (Figura 1). Atualmente, é consenso que a capacidade de formação de novos vasos sanguíneos, fenômeno denominado de angiogênese, a capacidade de burlar a apoptose, potencial e ilimitada capacidade replicativa, uma auto-suficiência de produzir sinais proliferativos, insensibilidade aos inibidores de crescimento e invasão de tecidos adjacentes e formação de metástase sejam características de todas as células neoplásicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000).



**Figura 1.** Ilustração das seis características das células cancerígenas. Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG (2011).

### 3.2 Câncer de mama

O câncer de mama compreende um grupo heterogêneo de doenças, com diferentes formas de apresentação clínica, características morfológicas e imunohistoquímica peculiares, apresentando uma resposta terapêutica diferenciada e associada a parâmetros prognósticos distintos (REIS-FILHO; TUTT, 2008; RAKHA; ELLIS, 2009; RAKHA et al., 2009, RAKHA; REIS-FILHO, 2009).

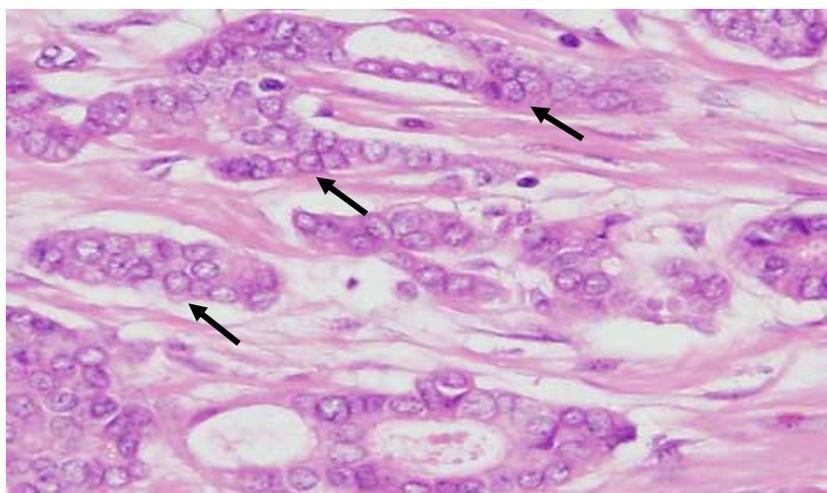
Esta neoplasia corresponde ao segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, correspondendo a aproximadamente 25% de todos os cânceres do sexo feminino. Entre as mulheres americanas é a

neoplasia mais comum, ficando apenas atrás do câncer de pulmão (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

No Brasil, estimativas para o ano de 2016, realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicam que ocorrerão mais de 600 mil novos casos de câncer, dos quais 57.960 será câncer de mama. Segundo as estimativas, os tipos mais incidentes nas mulheres com exceção do câncer de pele do tipo não melanoma serão os cânceres de mama e de colo do útero de útero (INCA, 2016).

A etiologia é desconhecida, entretanto, alguns fatores de risco podem estar envolvidos no desenvolvimento deste tumor como, por exemplo, menarca precoce, menopausa tardia, nulipariidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, terapia de reposição hormonal, exposição às radiações ionizantes, predisposição genética (RUBIN et al., 2006; SCHULZ, 2007).

O carcinoma ductal invasivo (CDI) corresponde em média a 75% dos carcinomas mamários. Macroscopicamente o CDI apresenta-se como uma massa palpável, endurecida e com bordas irregulares apresentando dois ou três centímetros em média. Histopatologicamente (Figura 2), as células formam estruturas glandulares, ninhos sólidos, cordões celulares de células tumorais e/ou um padrão misto. O tumor pode apresentar regiões de necrose, de microcalcificação, e de carcinoma *in situ*. O estroma geralmente é fibroso (FARIA, 1999; SCHMITT, 2011).



**Figura 2:** Corte histológico de um CDI, onde se observa células tumorais em um padrão de cordões sólidos (setas pretas) em meio ao tecido fibroso denso adjacente. Coloração H.E. Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/nptmeta3.html> acesso em 15 de Out. de 2010. Adaptado.

O CDI apresenta um comportamento clínico agressivo, que pode variar dependendo do estágio da doença e estadiamento do tumor, podendo evoluir rapidamente para o óbito. Com frequência, o diagnóstico se dá quando a doença já se encontra em estágio avançado com presença de metástases. Diante deste fato, o governo tem investido em campanhas e programas para conscientização da população acerca da realização da mamografia, uma vez que o diagnóstico precoce aumenta a sobrevivência bem como as chances de êxito do tratamento (SCHULZ, 2007).

Aproximadamente 20% dos CDI podem corresponder a subtipos histológicos específicos como tubular, medular, mucinoso, papilar, micropapilar ou metaplásico. Porém restante 80% dos CDI, não são subclassificados. Daí a designação carcinomas ductais “sem outra especificação” (SOE). Se comparados com relação ao prognóstico, os carcinomas ductais subtipos tubular, papilar e medular apresentam melhor prognóstico em relação ao carcinoma ductal SOE. Enquanto os subtipos micropapilar e metaplásico apresentam prognóstico mais sombrio (YODER et al., 2007).

O perfil radiográfico da mama, biópsia do tecido através de punção por agulha fina e/ou exame histopatológico para detecção de células tumorais no material e análise do perfil histoquímico e imunohistoquímico constituem metodologias mais utilizadas no diagnóstico da doença (RUBIN et al., 2006). A base do tratamento dos pacientes constitui-se de: mastectomia parcial ou total, (dependendo do quadro clínico), remoção de linfonodos axilares, quimioterapia e radioterapia e terapia hormonal. Dois ou mais métodos frequentemente são associados. A intensidade e duração do tratamento dependem de vários parâmetros prognósticos como estágio do tumor, presença de metástases bem como a identificação de alguns marcadores moleculares (SCHULZ, 2007; SCHMITT, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

A história natural das neoplasias malignas representa os eventos envolvidos na carcinogênese, crescimento, progressão e disseminação do tumor. A carcinogênese mamária se inicia com as alterações genéticas, representadas pela ativação de proto-oncogenes, como o *HER-2/c-erbB2/NEU*, *c-myc*, *ras*, dentre outros e com a perda de bloqueio de genes supressores (MENKE, 2007; CHAGAS, 2011).

Outros fatores também contribuem para o crescimento tumoral e estão representados pelos esteróides hormonais, dentre eles, o estrógeno e a progesterona; fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGFR), HER2 e peptídeos. Os receptores de estrógeno e a progesterona são responsáveis pela formação e crescimento inicial do tumor, regulando genes dos fatores de crescimento e do ciclo celular. Os tumores receptores positivos são geralmente bem diferenciados e as pacientes mostram melhor evolução clínica, quando comparadas com os tumores receptores negativos. Cerca de 60% dos carcinomas são receptores de estrógeno positivos, porém apenas 2/3 respondem ao tamoxifeno. O câncer de mama com receptores negativos mostra altos índices proliferativos, maior grau histológico e capacidade invasiva, além de expressão alterada de fatores de crescimento epidérmico. A expressão dos RE e RP tem valor prognóstico e preditivo para o intervalo livre de doença e sobrevida global. A presença do EGFR no câncer de mama se correlaciona com um pior prognóstico, independentemente do nível dos receptores hormonais. O HER-2 está envolvido no crescimento tumoral, diferenciação e prognóstico e sua superexpressão está associada à capacidade metastática e resistência a drogas quimioterápicas e anti-hormonais. A progressão tumoral se refere à capacidade invasiva e metastática e tem forte relação com a sobrevida e o prognóstico (MENKE, 2007).

O câncer de mama é uma doença heterogênea com distintos padrões morfológicos e evolutivos. A história natural do câncer de mama mostra que esses padrões variam de paciente para paciente. Essas variações se correlacionam com o comportamento biológico, com a capacidade metastática e de invasão local. O carcinoma mamário apresenta características clínicas e evolutivas heterogêneas que podem traduzir a diversidade biológica tumoral (ABREU, 2002).

### **3.3 Características morfológicas tumorais e marcadores moleculares**

Os fatores biológicos tumorais traduzem o estágio de desenvolvimento neoplásico, caracterizado pela medida do tumor; o crescimento pela atividade mitótica e a capacidade metastática pelo *status* axilar e metástase à distância. Além desses, os receptores hormonais e o marcador molecular, HER2 formam o

grupo de fatores prognósticos e preditivos, pois continuam direcionando as decisões terapêuticas (FITZGIBBONS, 2000; SINGLETARY, 2003).

O tamanho tumoral é uma variável significativa. Pacientes com carcinomas mamários de maior dimensão apresentam sobrevida menor e uma maior relação com metástases axilares. O acompanhamento de pacientes durante cinco anos, com tumores menores que 2,0 cm, sem metástase axilar apresentam taxa de sobrevida de 96,3%, enquanto aquelas com tumores com 5,0 cm ou maiores e com comprometimento axilar, apresentaram taxa de sobrevida de 45,5% (KOSCIELNY, 2009; ROSEN, 2009).

Aliada ao tamanho tumoral o grau histológico é uma estimativa da diferenciação tumoral da porção invasiva do tumor, sendo um importante fator prognóstico relacionado a metástases axilares e sistêmicas, a recidiva tumoral e menor intervalo livre de doença (ROSEN, 2009). Os sistemas de gradações mais utilizados são o Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis (FITZGIBBONS, 2000; ROSEN, 2009) e o de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991), que mostram valores preditivos semelhantes. Eles englobam o grau nuclear, o arquitetural e a contagem de mitoses. Pela soma dos escores de 1 a 3 para cada critério, o grau tumoral é categorizado em I, II e III, correspondendo à bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciados (CONNOLLY, 2006).

A atividade mitótica tumoral também faz parte do sistema de gradação histológica e pode ser considerado, isoladamente, um indicador de prognóstico. A marcação de proliferação pela imunohistoquímica do tumor representa uma medida estática da proliferação e os alvos são as células em mitose e os núcleos em prófase. O marcador utilizado para avaliar a proliferação, Ki-67 é um anticorpo monoclonal específico para células em proliferação durante todo o ciclo celular, com exceções em células com uma fase S prolongada ou em tumores já submetidos a quimioterápicos. Este anticorpo mostra associação significativa com o grau histológico, observando-se maior positividade em tumores pouco diferenciados e em comedocarcinomas (ROSEN, 2009).

O comprometimento linfonodal avaliado pelo estudo do esvaziamento axilar ou do linfonodo sentinela é o fator prognóstico mais importante no câncer de mama. O tamanho e a localização da metástase e o número de linfonodos comprometidos tem valor preditivo importante para sobrevida. Cerca de 20 a 30% das pacientes axila-negativas vão apresentar recidiva tumoral em 10 anos,

enquanto que nas pacientes axila-positivas observa-se um aumento dessa percentagem para 70%. O envolvimento linfonodal está associado ao tamanho tumoral, mas não mostra associação com receptores hormonais positivos e marcadores de proliferação (CHAGAS, 2011; MENKE, 2007).

As características morfológicas tumorais representam o produto final da interação entre diferentes classes de genes e proteínas e tipos distintos de células. As principais alterações de expressão gênica no câncer de mama estão relacionadas ao processo de tumorigênese. Neste contexto, durante esse processo há uma perda da expressão de genes relacionados à adesão, comunicação e forma celular, e ganho de outros como a expressão de enzimas metabólicas responsáveis pela proliferação celular (REIS-FILHO, 2005).

Observa-se que a expressão de alguns genes está relacionada a tumores de prognóstico bom ou reservado e que essas assinaturas genéticas podem ser utilizadas para reunir tumores em subtipos distintos, com implicações prognósticas e preditivas (CHANG, 2004; WANG, 2005) e que podem ser traduzidas na clínica, contudo seu custo ainda é elevado distanciando sua utilização na rotina diagnóstica (CHEANG, 2008; BLOWS, 2010; LEONG, 2011).

Por outro lado, a imunodeteção dos produtos proteicos dos genes relacionados ao prognóstico é viável. Além disso, é um método seguro e aplicado a variados tipos de amostra, tais como preparações citológicas, amostras de tecido congelado e em material fixado e em blocos de parafina. É um método de alta sensibilidade e especificidade na identificação de raras células tumorais, bem como de células ductais normais contaminantes (CHEANG, 2008; LEONG, 2011).

O estudo imunohistoquímico tem a vantagem de demonstrar a expressão proteica no contexto da morfologia tumoral. Presume-se que a expressão do RNA mensageiro, determinada pelo perfil de expressão gênica, se correlaciona diretamente com a expressão proteica semi-quantitativa determinada pela imunohistoquímica (BHARGAVA, 2009; LEONG, 2011).

Na patologia mamária a avaliação imunohistoquímica tem sido usada em diferentes situações, tais como expressão de fatores preditivos e prognósticos, pesquisa de células metastáticas em linfonodo sentinela, na origem de neoplasias metastáticas e no diagnóstico diferencial (MUNJAL, 2009). É importante ressaltar que a expressão dos receptores tem relação direta com a resposta terapêutica.

Tumores que expressam escores de 1% ou mais mostram significativo benefício com a terapêutica adjuvante (BADVE, 2009; DAABS, 2012).

Neste contexto a expressão dos receptores hormonais nos carcinomas mamários permanece ainda como o padrão definitivo para determinação da terapia hormonal. O principal propósito da avaliação da expressão dos receptores hormonais é definir o benefício clínico de um dado tratamento. Para isso, o entendimento da funcionalidade dos receptores é essencial, já que no estudo imunohistoquímico é caracterizado apenas a presença dos receptores, não se avaliando, por exemplo, as proteínas que participam da sinalização desses receptores (NOFECH-MOZES, 2012). Assim o escore imunohistoquímico é determinado pela percentagem de núcleos corados das células neoplásicas e pela intensidade da coloração. O Colégio Americano de Patologistas (CAP – *College of American Pathologists*) e a Sociedade Americana de Oncologistas Clínicos (ASCO-*American Society of Clinical Oncology*) consideram como expressão positiva dos receptores, a percentagem mínima de 1% de células tumorais coradas e como expressão negativa menos de 1% das células (ASCO/CAP, 2010; HAMMOND, 2010; NOFECH-MOZES, 2012).

Os tumores receptores hormonais positivos mostram associação com fatores de bom prognóstico como tamanho tumoral menor ou igual a 2,0 cm, linfonodos negativos e baixo grau histológico. Já os negativos com tumor maior que 2,0 cm, linfonodos positivos e alto grau histológico apresentam prognóstico reservado (ASCO/CAP, 2010).

Os tumores receptores positivos podem ser responsivos a terapia antiestrogênica, enquanto que os negativos são insensíveis (DAABS, 2012). Aproximadamente 75 a 80% dos cânceres de mama demonstram expressão nuclear do receptor de estrogênio, porém apenas 1/3 desses tumores respondem ao tamoxifeno (DAABS, 2012). A eficácia da terapia hormonal pode depender da ação de fatores de transcrição como o FOXA1, GATA-3 e fatores de crescimento, como o HER-2 e EGFR (BADVE, 2009).

O proto-oncogene HER-2/*neu* (*c-erbB-2*) codifica o receptor do fator de crescimento epidérmico do tipo 2 da família da tirosina-quinase. Essa proteína funciona como receptor celular e nas células neoplásicas malignas atua como fator de crescimento, na proliferação, diferenciação e na mobilidade e adesão celular. Na patogênese do câncer de mama, as alterações na expressão desse

proto-oncogene tem efeito comprovado. Observa-se que depois da amplificação do proto-oncogene, o fenótipo HER-2 é mantido durante toda a história natural do câncer invasivo, já que é observado no tumor primário e nas metástases (BURSTEIN, 2005).

Cerca de 10 a 30% dos carcinomas ductais invasivos mamários de alto grau, mostram superexpressão do HER-2, sendo rara, porém nos tipos histológicos especiais, tais como no lobular, tubular, mucinoso, cribiforme e papilífero (LAL, 2005; SCHMITT; GOBBI, 2011). Ao passo que em relação ao comprometimento linfonodal, pacientes axila-positiva com positividade para HER-2 estão associadas a diminuição do tempo de sobrevida e do tempo livre de doença e metástases à distância para fígado e pulmões (DABBS, 2012). A importância da superexpressão do HER-2 como fator preditivo é maior do que como fator prognóstico. O status do HER-2 é um fator preditivo de resposta a diferentes tratamentos. Há uma relativa sensibilidade ou resistência a vários tipos de tratamento, tais, como terapia endócrina, quimioterapia, radioterapia e o com anticorpos contra-HER-2 (PAYNE, 2008; DABBS, 2012).

Há vários métodos disponíveis para a detecção do HER2, com avaliação da sua amplificação e superexpressão. Os ensaios de *Northern*, *Southern* e *Western blot* são confiáveis, porém são de custo elevado e necessitam de amostras teciduais á fresco. Em amostras teciduais parafinadas, os métodos mais utilizados são o estudo imunohistoquímico, a hibridização por fluorescência ou a cromógena *in situ* denominadas FISH e CISH, respectivamente (DABBS, 2012).

O Colégio Americano de Patologistas (CAP) e a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO-*American Society of Clinical Oncology*) recomendam a determinação do status do HER-2 em todos os carcinomas infiltrantes da mama, principalmente após o benefício terapêutico do trastuzumabe. Em laboratórios de histopatologia, o estudo imunohistoquímico em material emblocado em parafina tem sido o método mais usado para determinar a superexpressão da proteína do HER-2/*neu* (SCHMITT; GOBBI, 2011; WOLFF, 2013).

A avaliação imunohistoquímica é determinada por um escore que vai do zero até 3+, baseado na proporção e na intensidade da coloração da membrana. Essa coloração deverá ser circunferencial, com um padrão reconhecido como “tela de galinheiro” (WOLFF, 2013). Contudo a hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) é uma técnica mais precisa para a avaliação quantitativa do oncogene

HER-2/*neu*, com o uso de sondas de DNA marcada com fluoresceína e pode ser usada em cortes histológicos e em preparados citológicos. A associação entre os escores negativos e positivos na imunohistoquímica com a amplificação gênica pelo FISH é alta, sendo observada em 80 a 90% dos casos. Porém, existem relatos de discordância em cerca de 4% a 20% de casos entre a imunohistoquímica e o FISH. Isso pode estar relacionado a falhas na fixação do tecido além da escolha do tipo de anticorpo usado (PEREZ, 2011; GOWN, 2008).

Nos tumores HER-2 com escore 2 +, considerados como indeterminados, a utilização da hibridização *in situ* é importante para determinar realmente a amplificação do gene. Esse escore é observado em cerca de 25% dos tumores infiltrantes da mama. Observa-se que grande parte desses tumores não mostram amplificação pelo FISH. Acredita-se que esses tumores com escore 2 + sejam biologicamente distintos do escore 3 +, e podem estar associados com a polissomia do cromossomo 17 com consequente aumento dos genes HER-2 (PEREZ, 2011; DABBS, 2012).

A hibridização *in situ* (FISH) é um método diagnóstico mais caro, com maior tempo de elaboração, e não é exame de rotina nos laboratórios de histopatologia. Por sua vez, o estudo imunohistoquímico é mais barato, mais rápido e já está bem estabelecido na rotina diária. Porém, a imunohistoquímica ainda demonstra problemas com a padronização e com caracterização de tumores que expressam HER2 e não mostram amplificação gênica (PAYNE, 2008; GOWN, 2008).

Diante dessas limitações, o uso da hibridização *in situ* cromógena (CISH) tem sido implementado. Esse método usa reação de imunohistoquímica, similar a peroxidase e permite a análise das cópias gênicas e da morfologia tumoral. É mais rápida e mais barata do que a técnica do FISH (SCHMITT; GOBBI, 2011; PAYNE, 2008). Na avaliação do HER2 e dos receptores hormonais, a imunohistoquímica e a hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) ainda são métodos mais utilizados e que substituem os estudos de expressão gênica, mais caros e que exigem mais tempo para realização. Porém, faz-se necessário desenvolver outros marcadores moleculares que possam caracterizar a homogeneidade dentro os subgrupos tumorais, bem como aumentar a especificidade do tratamento do câncer de mama (PAYNE, 2008).

### 3.4 Subtipos moleculares de carcinoma invasivo da mama

O estudo imunohistoquímico pode caracterizar os diversos fenótipos moleculares do carcinoma mamário, porém a determinação da heterogeneidade tumoral ainda permanece desafiadora. Observa-se que tumores mamários com a mesma classificação histológica podem ter variação no comportamento biológico e apresentar aspectos moleculares distintos evoluindo de forma diferente, sugerindo-se que outros fatores moleculares podem determinar a evolução da doença. Dessa forma, a caracterização desses aspectos moleculares pelos perfis de expressão gênica podem agrupar os tumores em diferentes classes moleculares (REIS-FILHO, 2005).

Os tumores luminais poderiam ser subdivididos em luminal A e luminal B. No primeiro, além da elevada expressão dos genes dos receptores de estrógeno (RE  $\alpha$ ), observou-se também, expressão da proteína de ligação GATA3, da proteína X-box de ligação 1, dentre outros. O subtipo luminal B, por sua vez, demonstrou menor expressão daqueles genes relacionados ao RE e maior expressão de genes relacionados à proliferação quando comparados ao luminal A (REIS FILHO, 2011). Contudo na determinação dos subtipos luminal A e luminal B as análises de agrupamento hierárquico da divisão entre estes subtipos pode ser subjetiva (MACKAY, 2011). Observou-se ainda que 8% a 11% dos tumores com subtipo luminal A e 15% a 24% com subtipo luminal B, determinados pela expressão gênica, poderiam mostrar superexpressão do HER-2 no estudo imunohistoquímico (PARKER, 2009; NIELSEN, 2010; PRAT, 2010). Diante disso, em 2011 na Conferência Internacional de Câncer de Mama de *St Gallen*, foi incluído no painel imunohistoquímico, a determinação do Ki-67 para a diferenciação daqueles subtipos luminal A e luminal B que são HER-2 negativos. Salientou-se que este painel era uma tentativa de aproximação da classificação dos subtipos definido pela expressão gênica (GOLDHIRSCH, 2011; GEYER et al., 2012; ALESKANDARANY, 2012).

O estudo imunohistoquímico permite categorizar grupos distintos de pacientes em subtipos moleculares que demonstram características biológicas e evolutivas semelhantes. Observa-se correlação positiva entre o perfil de expressão gênica e a expressão imunohistoquímica nos carcinomas mamários.

Isto pode ser reproduzido na rotina da patologia cirúrgica para categorização dos tumores em grupos com expressões fenotípicas semelhantes (KIM, 2006; CAREY, 2006; IRIGOYEN, 2011).

Inicialmente, a classificação dos subtipos moleculares pelo perfil imunohistoquímico, foi baseada na expressão de citoqueratinas (CK) basais e luminais sendo os tumores categorizados em fenótipos luminal; basal; basal e luminal combinados e o fenótipo nulo. Observou-se que os tumores com fenótipo basal-*símile* e basal/luminal combinado estavam associados com maior grau, maior tamanho, receptor de estrógeno (RE) negativo, recidiva tumoral, metástase à distância e óbito. Já os marcadores luminais estavam associados com fatores de bom prognóstico, sobrevida mais prolongada e positividade do RE (ABD-EL-REHIM, 2004).

Posteriormente, o subtipo luminal foi dividido de acordo com a expressão do HER-2 em luminal A (RE+/HER-2 -) e luminal B (RE+/HER-2+). Além disto, os tumores que eram RE - /HER2 + e que podiam expressar ou não os marcadores basais, foram denominados de basal-*simile* superexpressão de HER2, que correspondem ao subtipo HER2 +, referidos em outros trabalhos. Já os tumores de subtipo basal-*simile*, eram negativos para o RE e HER2, ou positivos para qualquer um dos marcadores CK5, p63 ou p-caderina (MATOS, 2005).

Em 2008 Cheang e colaboradores utilizando esse mesmo painel de marcadores imunohistoquímico, enfatizaram o papel dos marcadores basais, EGFR e as CK5/6, caracterizando os tumores do subtipo basal-*símile* por meio de duas classificações: a do triplo-negativo e a do método dos cinco marcadores. Pelo esquema do triplo-negativo, os tumores basais eram considerados, como aqueles que eram negativos para os receptores hormonais e a proteína HER2.

Na classificação pelo método dos cinco marcadores, os tumores que eram triplo-negativos, mas positivos para pelo menos um dos marcadores basais, eram classificados como core-basal e aqueles que eram negativos para todos os cinco marcadores foram classificados como de fenótipo “cinco marcadores negativos”. Salientou-se ainda que este último fenótipo pela classificação do triplo-negativo foi considerado também como do basal-*símile* (CHEANG, 2008). Considerando ainda qualquer que fosse a expressão imunohistoquímica destes marcadores basais, estes autores denominaram o subtipo luminal A como luminal linha (‘), o luminal B como luminal/HER2 + e o subtipo HER2 + como HER2 + /RE - / RP - .

Alguns autores demonstraram que este subtipo luminal estava associado a um bom prognóstico, com maior sobrevida (SORLIE, 2001; CAREY, 2006; CHEANG, 2008; DAWOOD, 2011). Em outro estudo, porém, observou-se que o subtipo “mama normal” estaria associado a uma pior sobrevida e a uma resposta ruim a quimioterapia adjuvante (CHOI, 2010).

Além dos subtipos moleculares já caracterizados foi identificado mais um, denominado *Claudin-low*. Estes tumores foram identificados pela baixa expressão de genes das proteínas envolvidas nas junções e na adesão celular denominada claudina 3,4 e 7 além da E-caderina (HERSCHKOWITZ, 2010).

Quando comparado aos outros subtipos, os tumores *Claudin-low* mostram baixa expressão de marcadores luminais, como os dos receptores hormonais, citoqueratinas (CKs) 8/18, baixa expressão de HER2 e expressão inconsistente de CKs basais. Devido a este perfil de expressão gênica, este subtipo se assemelha ao basal-*símile*. Por outro lado, observou-se expressão elevada de genes envolvidos na resposta imune, na comunicação celular, na migração e diferenciação celular e na angiogênese (PRAT, 2010).

As células tumorais no subtipo claudina-*low* demonstram um fenótipo da transição epitélio-mesênquima e de células tronco e que determinam resistência terapêutica. Estes tumores são negativos para os receptores hormonais e para a proteína HER2, além de mostrarem características de carcinoma medular ou metaplásico, com intenso infiltrado linfocitário. Estes tumores mostram pior sobrevida e maior recorrência tumoral quando comparados ao luminal A (PRAT, 2010; LU, 2013).

Na classificação molecular dos carcinomas mamários, a expressão do receptor de progesterona (RP) foi sendo adicionada de forma gradual. Os tumores mamários que são RE e RP negativos (duplo negativos) estão associados a maior agressividade e pior prognóstico, semelhantes aos tumores que são RE negativos (WEBSTER, 2008). Quando se compara os tumores que são RE positivo e RP negativo aos tumores que são duplo positivos (RE e RP positivos) observa-se que a negatividade do RP pode estar relacionada a uma evolução ruim com sobrevida curta e recidiva tumoral (RAKHA, 2007).

A superexpressão do HER-2 está correlacionada a fatores de pior prognóstico, tais como, maior grau histológico, maior tamanho tumoral, aneuploidia, alto índice de proliferação celular e receptores negativos (PINTO,

2001; LAL, 2005; SCHMITT; GOBBI, 2011). Observou-se que a expressão do HER-2 está concentrada nos carcinomas ductais invasivos de grau II e III, sendo associados a tumores mais agressivos e de pior prognóstico. Já nos carcinomas do tipo especial, que na maioria das vezes, são HER-2 negativo, o grau é mais baixo, e por isso são de melhor prognóstico (LAL, 2005).

A classificação dos carcinomas mamários em subtipos moleculares, traduz o perfil gênico e imunohistoquímico dos marcadores tumorais, bem como as associações entre eles. Assim, na última conferência de *St Gallen* em 2013, foi recomendado na classificação dos subtipos moleculares do carcinoma mamário, a determinação do receptor de estrógeno, do receptor de progesterona, da proteína HER2 e do Ki-67. Contudo, a utilização dos ensaios para as CK5/6 e o EGFR, não foram recomendados para determinação dos tumores com subtipo basal-*símile* nas decisões clínicas (GUIU, 2012; GOLDBIRSCH, 2013).

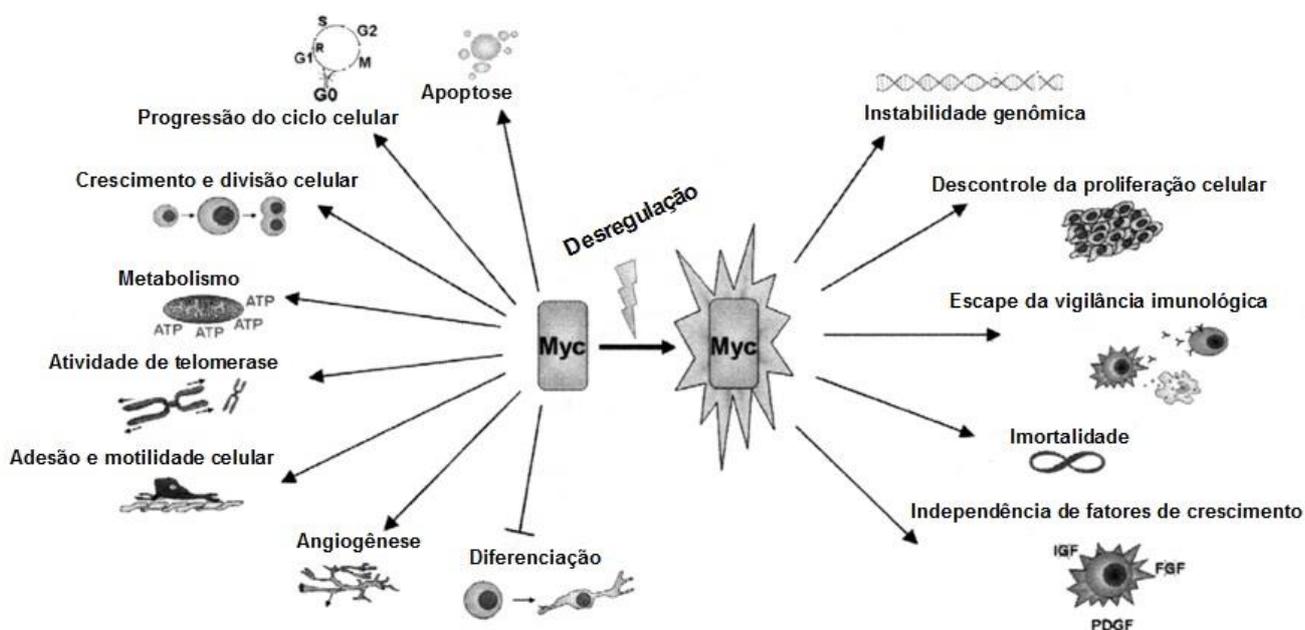
### 3.5 Proto-oncogene *c-myc*

A descoberta da família dos genes MYC data a partir de 1911 quando Peyton Rous observou que sarcoma de galinha podia ser transmitido por através de extratos tumorais livres de células, sugerindo que um vírus podia ser o agente de etiológico destes sarcomas. Baseado neste trabalho por Bishop e outros pesquisadores, estudaram um subgrupo específico de retrovírus aviário, que induzia leucemia, sarcomas, tumores no fígado, rim e outros tumores em aves. Estes estudos levaram à identificação do oncogene de *v-myc* (*myelocytomatosis viral oncogene homolog*) (FARIA; RABENHORST, 2006). Com a descoberta de um gene homólogo do *v-myc*, denominado de *c-myc*, localizado no braço longo do cromossomo 8 (8q24), reforçou a ideia de que oncogenes retrovirais de aves podiam ser capturados e atuar como reguladores do crescimento celular e ainda ser transmitidos de forma ativa. A descoberta de que cânceres em humanos frequentemente exibem expressão alterada do *c-myc* ratificou a importância deste gene na origem de neoplasias (MEYER; PENN, 2008).

Estudos realizados em décadas passadas contribuíram para o entendimento das funções do *c-myc* em células normais e neoplásicas. Em contraste com células normais nas quais *c-myc* é altamente regulado, em que o

gene é apenas expresso quando as células estão em divisão. Células cancerígenas podem expressar este gene de uma maneira descontrolada como resultado de aberrações genéticas (DALLA-FAVERA, 1982; BOXER; DANG, 2001). Atualmente, está bem estabelecido que a expressão desregulada do *c-myc* desempenha um papel significativo no desenvolvimento do câncer (TANSEY, 2014).

Logo depois da descoberta do gene *c-myc*, dois outros genes relacionados foram encontrados amplificados em cânceres humanos: o *N-myc* (nos neuroblastomas) e o *L-myc* (nos carcinomas do pulmão, do inglês *lung*) e estes constituem a família de genes MYC (FARIA; RABENHORST, 2006). Esta família codifica um grupo de fosfoproteínas nucleares que atuam como fatores de transcrição regulando genes envolvidos em diversos processos celulares como apoptose, progressão do ciclo celular, crescimento e divisão, metabolismo, adesão celular, motilidade, angiogênese e diferenciação (Figura 3). Alterações nos genes dessa família induzem à carcinogênese, através da instabilidade genômica, descontrola da proliferação celular, escape da vigilância do sistema imune, imortalização e a independência de fatores de crescimento (VITA; HENRIKSSON, 2006; MEYER; PENN, 2008).



**Figura 3.** Processos celulares controlados pela MYC em condições normais e durante carcinogênese. Fonte: adaptado de VITA; HENRIKSSON (2006).

Algumas propriedades dos genes MYC têm sido estudadas sugerindo que eles tenham funções similares, entretanto, em diferentes tipos celulares (STRIEDER; LUTZ, 2002). As proteínas MYC consistem de um domínio de transativação N-terminal (TAD) necessário para ativação transcricional e responsável pelo recrutamento de vários co-fatores transcricionais; uma região central, e um domínio C-terminal (CTD) que apresenta um basic/hélice-loop-hélice/leucina zipper (bHLHzip) (LU; PEARSON; LUNEC, 2003), necessário para dimerização com a proteína MAX (HLHzip) (Figura 4). Esses heterodímeros se ligam especificamente ao E-box em promotores controlando a transcrição de vários genes alvos (FARIA; RABENHORST, 2006; VITA; HENRIKSSON, 2006; LARSSON; HENRIKSSON, 2010).



**Figura 4.** Regiões da proteína myc. Fonte: adaptado de LU; PEARSON; LUNEC (2003).

A ativação inadequada do gene *c-myc*, que contribui para a gênese de diversos cânceres em humanos, pode ocorrer por diferentes mecanismos. Dentre eles podemos citar as translocações cromossômicas, como observado no linfoma de Burkitt, no qual a justaposição da região promotora do gene da cadeia pesa de imunoglobulina, região que apresenta uma alta atividade transcricional em células B, se liga ao lado do sítio gênico do *c-myc*. A inserção de sequências retrovirais próximas ao gene pode também levar a sua superexpressão, via sequências regulatórias virais. Outro mecanismo, a amplificação gênica, na qual há o aumento no número de cópias do gene sem que se observe qualquer alteração em sua sequência conduz ao aumento no número de cópias bem como níveis elevados de transcritos, produzindo anormalidades cariotípicas denominadas *Double Minutes* (DM) e região homogênea de coloração (HSR) (XU; CHEN; OLOPADE, 2010).

A desregulação da MYC confere uma vantagem seletiva em células neoplásicas, promovendo proliferação, sobrevivência, bloqueio da

diferenciação, transição epitelial-mesenquimal e instabilidade genética, podendo contribuir para a metástase (GRANDORI et al., 2000; PODSYPANINA, et al., 2008; SOUCEK et al., 2008; TRIMBOLI et al., 2008).

Alterações numéricas e estruturais no cromossomo 8 tem sido comumente observadas no câncer de mama e em vários outros tipos de tumores (SATO et al., 2006; HANSEL et al., 2008; PENG et al., 2011). Em sua grande maioria, estas alterações ocorrem como menor número de cópias, incluindo deleções parciais ou completas no 8p e ganhos no 8q (RUMMUKAINEN et al., 2001; LETESSIER et al., 2006). Altos níveis de amplificação têm sido encontrados não apenas no 8q24, mas também em outras regiões no cromossomo 8, como por exemplo 8p12, 8q21 (BUERGER et al., 1999; CINGOZ et al., 2003; CHOSCHZICK et al., 2010).

Escot e colaboradores na década de 1986, foram os primeiros a mostrar anormalidades do gene *c-myc* no câncer de mama. Na ocasião, o nível de amplificação detectado variou de baixa a moderado nos 32% dos casos. Ainda neste estudo, foi observado uma correlação entre amplificação e idade >50 anos (ESCOT et al, 1986). Desde então numerosos estudos tem sido realizados com o intuito de compreender o impacto da amplificação do gene *c-myc* no câncer de mama (MEYER; PENN, 2008).

O papel do *c-myc* na patogênese do câncer de mama não é bem compreendido (ZAJAC-KAYE, 2001). A amplificação do *c-myc* está associada a tumores em estado avançado e com grande probabilidade de progressão e recidiva (BLANCATO et al., 2004). Estudos têm investigando a influência prognóstica e o impacto terapêutico de alguns marcadores moleculares no carcinoma ductal invasivo. Neste contexto o gene *c-myc* configura destaque. Um estudo com mulheres egípcias foi observado que o *c-myc* amplificado foi identificado como um dos fatores genéticos que adicionou significância prognóstica às variáveis clínicas, tal como tamanho do tumor, grau e estágio da doença (ISMAIL et al., 2009).

O oncogene *c-myc* tem sido mostrado amplificado e/ou superexpresso em muitos tipos de câncer, notadamente em tumores de mama (RODRIGUEZ-PINILLA et al., 2007; ISMAIL et al., 2009; YASOJIMA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011; ZITTERBART et al., 2011). A frequência de amplificação, superexpressão do mRNA e da proteica no câncer de mama varia entre 1 a 94%, 22 a 95% e 50 a 100% respectivamente (BARSYTE-LOVEJOY et al., 2006). Já outros estudos, tem

relatado uma alta frequência desta alteração no câncer de mama e em outras neoplasias (BLANCATO et al., 2004; KORSHUNOV et al., 2010; TODOROVIĆ-RAKOVIĆ; NEŠKOVIĆ-KONSTANTINOVIĆ; NIKOLIĆ-VUKOSAVLJEVIĆ, 2011).

Atualmente, é consenso que pacientes portadores de câncer de mama e que tenham amplificação do gene *c-myc* geralmente apresentam um prognóstico sombrio (TANSEY, 2014). Contudo, antes disso, diversas pesquisas foram realizadas para comprovar tal afirmativa. Nesta perspectiva, um estudo clássico realizado nos anos noventa com dois grupos de tumores obtidos no mesmo tempo e antes de terem iniciado o tratamento foram estudados. O primeiro grupo foi obtido de pacientes que após a cirurgia inicial tiveram uma média superior a 6,4 anos sobrevida livre de doença (DFS). Enquanto o segundo grupo foi obtido de pacientes que tiveram recorrência da doença ou progressão rápida (média DFS = 1,4 anos). Foi observado que os tumores do último grupo tiveram quase o dobro do nível de amplificação de *c-myc* (56% vs 30%), e amplificação do gene *Her-2* equivalentes.

Além disso, foi observado que este marcador pode ser útil para estratificar pacientes em grupos de risco distintos mediante análise de parâmetros clínico-patológicos aliados a outros marcadores moleculares. Também foi observado que o *c-myc* amplificado foi identificado como um dos fatores genéticos que adicionou significância prognóstica às variáveis clínicas, tais como tamanho do tumor, grau e estágio da doença (ISMAIL et al., 2009). Entre tanto, ao contrário da amplificação e superexpressão do oncogene *Her-2*, na qual já existe um consenso quanto a sua aplicação clínica devido ao seu impacto terapêutico (JAHANZEB, 2008; SINGER et al., 2008), para o *c-myc* amplificado, ainda não se observa tal associação apesar de estudos mostrarem que sua amplificação está associada a fenótipos mais agressivos (WOLFER et al., 2010) e prognóstico desfavorável na presença marcador molecular (BOUCHALOVA et al., 2009; ISMAIL et al., 2009; YASOJIMA et al., 2011).

Atualmente têm-se estudado a utilidade deste biomarcador em associação com outros para se avaliar resposta terapêutica (YASOJIMA et al., 2011) e estratificar pacientes em diferentes grupos de risco (ISMAIL et al., 2009). Fato que ilustra o relevante papel deste gene no câncer de mama.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Desenho do Estudo

Estudo retrospectivo descritivo e experimental do tipo transversal. O estudo descritivo foi realizado no Setor de Patologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas-UFPE (HC/UFPE) e as análises experimentais foram realizadas no Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### 4.2 Amostras

Foram selecionados 60 blocos de peças cirúrgicas, fixadas em formalina e embebidas em parafina, diagnosticadas entre os anos de 2009 a 2013 como carcinoma ductal invasivo oriundas do Arquivo do Setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas - UFPE. As amostras foram reavaliadas por um patologista (M.A.) para confirmação diagnóstica antes do seu uso no estudo. Os dados referentes à caracterização clínico-patológica dos carcinomas ductais invasivos (idade, tamanho do tumor, grau histológico e nuclear, estadiamento ao diagnóstico, tipo histológico e *status* de comprometimento linfonodal), foram obtidos dos prontuários e laudos histopatológicos resguardando-se a identificação dos pacientes. Os tumores foram classificados em quatro subtipos moleculares (Luminal A, Luminal B, superexpressão de HER-2 e Triplo-Negativo) após avaliação da reação imunohistoquímica (CHEANG et al., 2009; GOLDBIRSCH et al., 2013).

### 4.3 Critérios de Elegibilidade

Foram incluídas no estudo amostras diagnosticadas como carcinoma ductal invasivo da mama (CDI) apresentando estado de preservação adequados e em quantidade suficiente de material para ser analisado e com informações sobre os dados clínico-patológicos completos (idade no momento ao diagnóstico, tamanho do tumor pós-operatório, estadiamento patológico do tumor, *status* de comprometimento linfonodal, grau histológico e grau nuclear). Foram excluídos do estudo amostras de pacientes que não puderam ser analisadas devido à exiguidade do material (quantidade insuficiente devido ao desgaste e em tamanho muito pequeno), por má fixação; e amostras que não puderam ser resgatadas

para análise por se encontrarem em processo de revisão anatomopatológica no próprio setor ou em outros laboratórios. Também foram excluídos pacientes que fizeram terapia neoadjuvante devido ao fato desta poder interferir na expressão alguns biomarcadores avaliados neste estudo.

#### 4.4 Imunohistoquímica

Cortes de biópsias de carcinoma ductal invasivo (4µm) foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%), seguidos de incubação em hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) por 10 minutos e recuperação antigênica em tampão citrato à 10mM, pH 6.0 em câmara de vapor de água (STIMER) por 30 minutos. Após o resfriamento, os cortes foram incubados com solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em metanol (1:1) por 30 minutos a 25°C seguido de incubação com solução de albumina sérica bovina (*bovine serum albumin* - BSA) a 1% em PBS por 45 minutos a 25°C. Os tecidos foram, então, incubados *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos e suas respectivas diluições, (Tabela 1), seguidos de incubação com anticorpo secundário (*ADVANCE™ HRP LINK*) por 45 minutos a 25°C e, finalmente, com o anticorpo terciário (*ADVANCE™ HRP ENZIME*) por 45 minutos a 25°C. Para revelação da reação os cortes foram incubados com diaminobenzidina (DAB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em seguida os cortes foram contra corados com hematoxilina, reidratadas gradualmente em álcool etílico (70%, 80%, 95% e 100%), mergulhadas em xilol, montadas e analisadas em microscopia de campo óptico. O protocolo foi adaptado a partir de Ferreira et al., (2013).

**Tabela 01:** Anticorpos primários utilizados nas realizações de imunohistoquímica para caracterização molecular dos espécimes tumorais.

Anticorpo	Fonte	Clone	Diluição	Controle Positivo
Her-2	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA	CB11	1:100	Mama não neoplásica humana
RE	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA	L20	1:50	Mama não neoplásica humana
PR	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA	AB-52	1:50	Mama não neoplásica humana
Ki-67	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA	Ki-67	1:50	Tonsila humana não neoplásica
C-myc	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA	9E10	1:50	Intestino humano não neoplásica

HER-2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2. RE: Receptor de estrogênio; RP: Receptor de progesterona; Ki-67: Antígeno de proliferação Ki-67. C-myc: mielocitomatose celular.

Para a avaliação da expressão de Her-2 os tumores foram classificados em negativo: ausência de imunorreatividade ou quando a marcação na membrana era incompleta e fracamente perceptível em uma população  $\leq 10\%$  das células tumorais (*score 0*). Ou quando a imunomarcação membranar era incompleta e fracamente perceptível em uma população  $> 10\%$  das células tumorais (*score 1+*). O resultado foi considerado inconclusivo quando a imunomarcação na circunferência da membrana citoplasmática era incompleta e/ou moderada em uma população  $> 10\%$  das células. Ou quando a imunomarcação na circunferência da membrana era completa e intensa uma população  $\leq 10\%$  das células tumorais (*score 2+*). Nestes casos, foi realizada a técnica de hibridização *in situ* cromógena (CISH) para avaliação da amplificação gênica nos espécimes. A imunorreatividade para Her-2 era positiva quando a imunomarcação na circunferência da membrana era completa e intensa uma população  $> 10\%$  das células tumorais (*score 3+*). As descrições e interpretações do perfil de expressão de HER-2 seguiram os critérios descritos por Wolff et al, (2013).

Para os receptores hormonais: receptor de estrógeno (RE) e progesterona (RP) foram considerados positivos os espécimes que apresentaram marcação nuclear  $\geq 10\%$  das células, como descrito por Hammond et al, (2010).

O antígeno de proliferação Ki-67 foi determinado quanto ao percentual de imunorreatividade nuclear em dois perfis de expressão utilizado o seguinte *cut off*: tumores com expressão  $< 14\%$  (baixa expressão) e  $\geq 14\%$  (alta expressão) de positividade nuclear como descrito por Cheang et al, (2009).

A avaliação da imunorreatividade de C-myc seguiu o seguinte critério: independentemente da intensidade da marcação, qualquer que fosse a coloração do núcleo (com ou sem coloração do citoplasma) as amostras eram consideradas positivas para a expressão. Assim, se 10% ou mais das células tumorais apresentassem imunomarcação para C-myc, o paciente era classificado como positivo para expressão (KHALEGHIAN et al., 2015).

A estratificação dos tumores de mama em subtipos de moleculares seguiu os critérios sugeridos por Cheang et al., (2009) e Goldhirsch et al., (2013). Assim os mesmos foram classificados em quatro subtipos considerando o perfil imunohistoquímico em: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de Her-2 e Triplo negativo. A tabela 2 descreve os critérios e o perfil de expressão

imunohistoquímico adotados neste estudo para a classificação dos carcinomas mamários em subtipos moleculares específicos.

**Tabela 02** - Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama.

<b>Subtipo Molecular</b>	<b>Perfil de Imunomarcção</b>		
<b>Luminal A</b>	RE+ e/ou RP+	HER-2 -	Ki-67 < 14%
<b>Luminal B</b>	RE+ e/ou RP+ *RE+ e/ou RP+	HER-2 - *HER-2+	Ki-67 ≥ 14%
<b>Superexpressão de Her-2</b>	RE-, RP-	HER-2 +	
<b>Triplo-negativo</b>	RE-, RP-	HER-2 -	

HER-2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; Ki-67: antígeno de proliferação Ki-67. \*Subtipo molecular Luminal B HER-2. Fonte: adaptado de Goldhirsch et al., (2013).

#### 4.5 Hibridização *in situ* Cromógena

Cortes de biópsias de carcinoma ductal invasivo (4µm) foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida as lâminas foram incubadas na solução de pré-tratamento (*Cód.PT-0002-500\_ZytoVision*) aquecida previamente a 98°C durante 15 minutos. Os cortes foram tratados com o reagente de digestão enzimática (*Cód.ES-0001-4\_ZytoVision*) por 10 minutos a 25°C. Em seguida os cortes foram desidratadas em etanol (70%, 85%, 95%, 100% e 100% por 2 minutos cada) e seca ao ar livre por 10 minutos. Após a secagem, os tecidos receberam 10µL de sonda gene específica (Tabela 3) e foram incubados em estufa por 6 minutos a 96°C seguido de incubação a 37°C *overnight* em hibridizador (Hybridization oven/shaker-*RPM2510E\_Amersham Biosciences*). Após a hibridização e lavagem em tampão 0,5X SSC (*Cód.WB-0001-500\_ZytoVision*) a 25°C e em tampão 0,5X SSC a 75°C por 5 minutos os cortes foram mergulhados em solução 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Cód.311784\_Nuclear*) durante 10 minutos. Os cortes foram então incubado em solução de bloqueio (*Cód.BS-0001-4\_ZytoVision*) por 10 minutos a 25°C seguida de incubação com anticorpo de camundongo anti-digoxigenina (*Cód.AB-0001-4\_ZytoVision*) por 30 minutos e anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (*Cód.AB-0002-4\_ZytoVision*) por 30 minutos, separadamente. A

revelação foi realizada solução de Diaminobenzidina-DAB1a (Cód.SB-0001a-0.3\_ZytoVision) e solução DAB1b (Cód.SB-0001b-2\_ZytoVision) por 30 minutos. Os tecidos foram contra corados com hematoxilina (Cód.S21-MJ1\_ZytoVision) por 10 segundos e, finalmente, foram submergidos em etanol (70, 85, 95, 100 e 100%) e xilol, e montados para análise.

A análise da marcação dos cortes submetidos a hibridização cromógena *in situ* foi realizada através de microscopia de campo luminoso (Nikon, Eclipse-50i USA) na objetiva do 40x. Os tumores foram classificados em *não amplificados* quando mais de 50% dos núcleos apresentavam um número de 1 a 5 cópias do gene. *Baixa amplificação*: quando mais de 50% dos núcleos apresentavam um número de 6 a 10 cópias do gene por núcleo. *Amplificados*: quando mais de 50% dos núcleos apresentavam número de cópias do gene maior do que dez ou quando se observava nos núcleos região homogênea de coloração em mais de 50% dos mesmos. Como descrito por TANNER et al., (2000), utilizando o ZytoDot CISH Implementation Kit (Cód.C-3018-40) da ZytoVision.

**Tabela 03:** Sondas utilizadas na realização da hibridização *in situ* Cromógena nos espécimes do estudo.

Sonda	Empresa	Locus	Volume de uso	Controle Positivo
Her-2	ZytoVision, Germany	17q12	10µl	Linhagens de células humanas apresentando amplificação
C-myc	ZytoVision, Germany	8q24	10µl	Linfonodo humano não neoplásico

*HER-2*: Gene do Receptor para o fator de crescimento epidérmico humano 2. *C-myc*: Gene de mielocitomatose celular.

#### 4.6 Análise Digital de Imagens

Para analisar as amostras submetidas à técnica imunohistoquímica foi utilizado um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon, Eclipse-50i USA). Foram analisadas áreas aleatórias ( $\mu\text{m}^2$ ) e número de células marcadas por área. A análise quantitativa das células das marcas será aferida utilizando sistema automático, estudando-se três áreas em cada

caso. A análise quantitativa das células marcadas será aferida utilizando sistema automático, estudando-se áreas aleatórias em cada caso.

#### **4.7 Análise Estatística**

Os dados da caracterização dos carcinomas ductais invasivos foram descritos utilizando seus valores absolutos e relativos e expressos na forma de gráficos e tabelas. Também, a análise da correlação entre os dados clínico-patológicos das amostras dos tumores de mama e os resultados imunohistoquímicos dos biomarcadores estudados foram realizados através do teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e/ou teste exato de Fischer utilizando o programa computacional *Prism 5 for Windows* (GraphPad Prism 5.0). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .

#### **4.8 Aspectos Éticos**

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (CAAE 06586612.9.0000.5208–Parecer No. 140.876 em 07/11/2012).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ARTIGO 1: ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE C-MYC EM SUBTIPOS MOLECULARES DE CARCINOMA DA MAMA EMPREGANDO A TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* CROMÓGENA

MOLECULAR SUBTYPES OF BREAST CANCER: STUDY OF C-MYC AMPLIFICATION USING CHROMOGENIC *IN SITU* HYBRIDIZATION METHOD

Silva-Filho, J.L.Q.<sup>1</sup>, Vasconcelos, J.L.A.<sup>1</sup>, Ferreira, A.S.<sup>1</sup>, Nascimento, J.C.F.<sup>1</sup>, Cavalcanti, C.L.B.<sup>1</sup>, Beltrão, E.I.C.<sup>1,2</sup>

1 Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

2 Departamento de Bioquímica – Centro de Biociências (CB) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Correspondence: Eduardo Beltrão. LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – CDU, Recife, PE – Brasil. 50670-901. E-mail: ebeltrao@hotmail.com

Suporte financeiro: CNPq e FACEPE.

## RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, correspondendo a 25% de todos os cânceres do sexo feminino. No Brasil, representa a primeira incidência de neoplasia na mulher. Assim, o estudo de alguns biomarcadores pode auxiliar na compreensão da progressão, bem como no planejamento de terapias mais adequadas mediante a caracterização molecular destes tumores. O gene *c-myc* está localizado no 8q24 e codifica fatores de transcrição que participam direta e indiretamente na regulação do ciclo celular, diferenciação, metabolismo, crescimento, apoptose, instabilidade genômica, angiogênese e imortalização. O *c-myc* tem sido apontado como peça central no processo tumorigênico e sua amplificação está relacionada com carcinomas ductal invasivos (CDI). Este estudo tem como objetivo avaliar a amplificação de *c-myc* utilizando a hibridização *in situ* cromógena (CISH) e correlacionar este marcador molecular com parâmetros clínico-patológicos. Sessenta biópsias de carcinoma ductal invasivo foram analisadas. Os subtipos de CDI mais frequentes foram o luminal A (37,7%) e o triplo negativo (40%). Os subtipos luminais mostraram ser bem diferenciados em relação ao grau histológico ( $p=0.0135$ ). Em contraste com os carcinomas basal e superexpressão HER-2. Maiores, pouco diferenciados ( $p= 0.0570$ ), com comprometimento linfonodal e estadio avançado ao diagnóstico. A amplificação do oncogene *c-myc* foi observada em 21 tumores (35%). Com relação a presença e ausência de amplificação de *c-myc* entre os subtipos de carcinoma da mama, não foi observada diferença estatística. Uma melhor compreensão do comportamento dos tumores com amplificação e do seu impacto clínico combinado com outros parâmetros moleculares poderá ajudar a estratificar pacientes em grupos de risco e conduzir a terapias mais específicas.

**Palavras-chave:** Câncer de mama, *c-myc*, subtipos moleculares, amplificação gênica, hibridização *in situ* cromógena

## ABSTRACT

Breast cancer is the second most common cancer worldwide among women, accounting for 25% of all female cancers. In Brazil, it is the most incident cancer in women. In this context, the study of some markers may help the understanding of disease progression, as well as planning the most appropriate therapy. *C-myc* gene is involved in cell differentiation, apoptosis, angiogenesis and immortalization, playing central role in the tumorigenic process and its amplification is associated with invasive ductal carcinomas (IDC). This study aimed to evaluate *c-myc* amplification using chromogenic *in situ* hybridization (CISH) and to correlate this molecular marker with clinic-pathological features. Biopsies (n=60) invasive ductal carcinoma (IDC) were analyzed. The most frequent molecular sub-types of IDC were Luminal A (37.7%) and triple-negative (40%). Luminal sub-type showed to be well differentiated tumours regarding histological grade ( $p=0.0135$ ). On the contrary, the basal type and superexpressed HER-2 carcinomas presented larger and poorly differentiated tumors ( $p= 0.0570$ ) with linfonodes involvement and advanced stages at the time of diagnosis. We observed *c-myc* oncogene amplification in 21 tumours (35%). No statistical difference between amplified and non-amplified and molecular subtypes of IDC was found. A better understanding of tumors behavior of *c-myc* amplification and its clinical impact, combined with other molecular parameters, will help to stratify patients into risk groups and to conduct more targeted therapies.

**Key Words:** Breast cancer, *c-myc*, molecular subtypes, gene amplification, chromogenic in situ hybridization

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, correspondendo a 25% de todos os cânceres do sexo feminino. Entre as mulheres americanas é a neoplasia mais comum, ficando apenas atrás do câncer de pulmão (IARC, 2016; AMERICAM CANCER SOCIETY, 2016).

No Brasil, estimativas para o ano de 2016, indicam que ocorrerão mais de 600 mil novos casos de câncer, dos quais 57.960 será câncer de mama (INCA, 2016).

A etiologia é desconhecida, entretanto, alguns fatores de risco podem estar envolvidos como, por exemplo, menarca precoce, menopausa tardia, nulipariadade, idade da primeira gestação, uso de anticoncepcionais, terapia de reposição hormonal, exposição às radiações ionizantes, pré-disposição genética (SCHULZ, 2007).

O câncer da mama é subdividido em vários tipos, que diferem por sua morfologia, características moleculares e evolução clínica. Os fatores prognósticos que indicam a evolução da doença incluem grau do tumor, tamanho e proliferação (SIMPSON et al., 2005; LOPEZ-GARCIA et al., 2010).

O carcinoma ductal invasivo, via de regra, apresenta um comportamento clínico agressivo, e uma resposta terapêutica que pode variar a depender do seu estágio, estadiamento bem como a presença de alguns marcadores moleculares (SCHULZ, 2007; HAAS et al., 2011; PEROU, 2011).

Alterações numéricas e estruturais no cromossomo 8 tem sido comumente observadas no câncer de mama (TIRKKONEN et al., 1998; COURJAL; THEILLET 1997; KALTZ-WITTMER et al., 2000; LAMBROS et al., 2006) e em vários outros tipos de tumores (SATO et al., 2006; HANSEL et al., 2008; PENG et al., 2011). Em sua grande maioria, estas alterações ocorrem como mudanças de baixo nível no número de cópias, incluindo deleções parciais ou completas no 8p e ganhos no 8q (RUMMUKAINEN et al., 2001; LETESSIER et al., 2006). Altos níveis de amplificação têm sido encontrados não apenas no 8q24, mas também em outras regiões no cromossomo 8, como por exemplo 8p12, 8q21 (BUERGER et al., 1999; CINGOZ et al., 2003; CHOSCHZICK et al., 2010).

Amplificação do gene é um importante mecanismo para superexpressão protéica e ativação de oncogenes no câncer (MYLLYKANGAS; BOHLING; KNUUTILA, 2007). O proto-oncogene *c-myc*, (homólogo ao oncogene viral *v-myc* causador de mielocitomatose em de aves), localizado no braço longo do cromossomo 8 (VARMUS, 1984) é em geral, alvo de amplificação (ESCOT et al 1986). A qual pode ser observada na forma dúplos-mínusculos (DMs) e/ou região homogênea de coloração (HSR) (BIZARI; SILVA; TAJARA, 2006). O produto gênico do *c-myc* consiste em um fator de transcrição envolvido na proliferação, divisão, crescimento, metabolismo diferenciação e apoptose celular. A desregulação do *c-myc* pode induzir à carcinogênese, através da instabilidade genômica, descontrole da proliferação celular, escape da vigilância do sistema imune, imortalização e a independência de fatores de crescimento (VITA; HENRIKSSON, 2006; MEYER; PENN, 2008).

O oncogene *c-myc* tem sido mostrado amplificado e/ou superexpresso em muitos tipos de câncer, inclusive em tumores de mama (RODRIGUEZ-PINILLA et al., 2007; ISMAIL et al., 2009; YASOJIMA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011; ZITTERBART et al., 2011). A frequência de sua amplificação, superexpressão do mRNA e da protéica no câncer de mama variam (LIAO; DICKSON; 2000; BARSYTE-LOVEJOY et al., 2006). Estudos têm mostrado *c-myc* amplificado no câncer de mama e em outras neoplasias (BLANCATO et al., 2004; KORSHUNOV et al., 2010; TODOROVIĆ-RAKOVIĆ; NEŠKOVIĆ-KONSTANTINOVIĆ; NIKOLIĆ-VUKOSAVLJEVIĆ, 2011). Apesar disto, a frequência exata de sua amplificação não é muito clara variando muito dependendo do tipo de estudo e técnica empregada (DEMING et al., 2000).

Ao contrário da amplificação e superexpressão do oncogene *HER-2*, na qual já existe um consenso quanto a sua aplicação clínica devido ao seu impacto terapêutico (LEYLAND-JONES, 2002; JAHANZEB, 2008; SINGER et al., 2008), para o *c-myc* amplificado, ainda não se observa tal associação apesar de estudos mostrarem que sua amplificação está associada a fenótipos mais agressivos (WOLFER et al., 2010) e prognóstico desfavorável na presença marcador molecular (BOUCHALOVA et al., 2009, ISMAIL et al., 2009; YASOJIMA et al., 2011).

Atualmente têm-se estudado a utilidade deste biomarcador em associação com outros para se avaliar resposta terapêutica (YASOJIMA et al., 2011) e

estratificar tumores em diferentes grupos de risco (ISMAIL et al, 2009). Fato que ilustra o relevante papel deste gene no câncer de mama. Neste sentido, objetivo deste trabalho é investigar a relação da amplificação do gene *c-myc* com fatores prognósticos entre os subtipos moleculares de câncer de mama.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

**Desenho do estudo:** trata-se de um estudo retrospectivo descritivo e experimental do tipo transversal. O estudo descritivo foi realizado no Setor de Patologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas-UFPE (HC/UFPE) e as análises experimentais foram realizadas no Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/ UFPE).

**Amostras:** foram selecionados 60 blocos de biópsias diagnosticadas como carcinoma ductal invasivo (CDI) do arquivo do Setor de Patologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas-UFPE. Após análise de um patologista (M.A) para confirmação diagnóstica os espécimes foram utilizados no estudo experimental. Os dados referentes à caracterização clínico-patológica (idade, tamanho do tumor, grau histológico e nuclear, estadiamento ao diagnóstico, tipo histológico e *status* de comprometimento linfonodal), foram obtidos dos prontuários e laudos histopatológicos, resguardada a identidade dos pacientes.

**Critério de inclusão e exclusão:** foram incluídas no estudo amostras diagnosticadas como carcinoma ductal invasivo da mama (CDI) apresentando estado de preservação adequados e em quantidade suficiente de material para ser analisado e com informações sobre os dados clínico-patológicos completos (idade no momento ao diagnóstico, tamanho do tumor pós-operatório, estadiamento patológico do tumor, *status* de comprometimento linfonodal e grau histológico e grau nuclear). Foram excluídos do estudo amostras de pacientes que não puderam ser analisadas devido à exiguidade do material. Amostras que não puderam ser resgatadas para análise por se encontrarem em processo de revisão

anatomopatológica no próprio setor ou em outros laboratórios. Também foram excluídos pacientes que fizeram terapia neoadjuvante devido ao fato desta poder interferir na expressão alguns biomarcadores avaliados neste estudo.

**Imunohistoquímica:** amostras de biópsias de CDI, fixados em formalina e embebidos em parafina, foram seccionados em micrótomo (4µm) e fixadas em lâminas histológicas previamente silanizadas. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol por 1 hora a 60°C seguido por 30 minutos a 25°C e reidratadas em álcool etílico graduado (100 - 70%). Os tecidos foram então incubados em solução de hidróxido de amônio a 10% (NH<sub>4</sub>OH) em metanol por 10 minutos a 25°C seguido de incubação em tampão citrato 10mM (pH 6,0), por 30 minutos a 25°C e posteriormente em solução de metanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,3% por 30 minutos a 25°C. Os tecidos foram incubados em solução de BSA 1% em PBS por 1 hora a 25°C. Na sequência os tecidos foram incubados *overnight* a 4°C com os anticorpos primários específicos, separadamente (Tabela 1), seguido de incubação com o anticorpo secundário (*ADVANCE™ HRP LINK*) por 45 minutos a 25°C e anticorpo terciário (*ADVANCE™ HRP ENZIME*) por 45 minutos a 25°C. A revelação foi realizada usando uma solução de diaminobenzidina (DAB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os cortes foram contra-colorados com hematoxilina, montadas em Entelan e analisadas em microscópio óptico (FERREIRA et al., 2013).

**Tabela 01:** Anticorpos primários utilizados nas realizações de imunohistoquímica para caracterização molecular dos espécimes tumorais.

Anticorpo	Empresa	Clone	Diluição de uso	Controle Positivo
HER-2	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA	CB11	1:100	Mama neoplásica humana
RE	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA	L20	1:50	Mama não neoplásica humana
PR	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA	AB-52	1:50	Mama não neoplásica humana
Ki-67	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA	Ki-67	1:50	Tonsila humana não neoplásica

HER-2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2. RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; Ki-67: Antígeno de proliferação Ki-67.

**Crêterios de Interpreta o:** Para a avalia o da expressão de HER-2 os tumores foram classificados em negativos: imunorreatividade com *score* 0 ou 1+. E positivo: (*score* 3+) ou *score* 2+ para imunohistoquímica com amplifica o de *Her-2* por hibridiza o *in situ* cromógena (CISH). De acordo com o guia de diretrizes e recomenda es ASCO/CAP HER-2 (2013). Para os receptores hormonais: receptor de estrógeno (RE) e progesterona (RP) foram considerados positivos quando tinham imunomarca o nuclear  $\geq 10\%$  das células. De acordo com o guia de recomenda es de diretrizes para ER/PR ASCO/CAP (2010). O antígeno de prolifera o celular Ki-67 foi determinado utilizando o seguinte *cut off*: tumores com expressão  $< 14\%$  (baixa expressão) e  $\geq 14\%$  (alta expressão) de positividade nuclear como descrito por Cheang et al., (2009).

A classifica o dos tumores em subtipos de moleculares seguiu os cr terios adotados nas diretrizes e recomenda es do *St Gallen* (2013). Assim os mesmos foram classificados em quatro subtipos considerando o perfil imunohistoquímico em: Luminal A, Luminal B, Super-expressão de HER-2 e Triplo negativo (Tabela 2).

**Tabela 02** - Perfis imunofenotípicos para a classifica o molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama.

<b>Subtipo Molecular</b>	<b>Perfil de Imunomarca�o</b>		
<b>Luminal A</b>	RE+ e/ou RP+	HER-2 -	Ki-67 < 14%
<b>Luminal B</b>	RE+ e/ou RP+ *RE+ e/ou RP+	HER-2 - *HER-2+	Ki-67 $\geq 14\%$
<b>Superexpressão de Her-2</b>	RE-, RP-	HER-2 +	
<b>Triplo-negativo</b>	RE-, RP-	HER-2 -	

HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; RE: receptor de estrog nio; RP: receptor de progesterona; Ki-67: antígeno de prolifera o Ki-67. \*Subtipo molecular Luminal B Her-2+ Adaptado de Goldhirsch et al, (2013).

**Hibridiza o *in situ* cromógena:** os cortes das biópsias de CDI (4 m) fixados em lâminas histológicas foram desparafinizados em xilol e incubadas em soluço de pré-tratamento (*Cód.PT-0002-500\_ZytoVision*) por 15 minutos a 98 C. Os cortes foram então tratados com o reagente de digestão enzimática (*Cód.ES-0001-4\_ZytoVision*) por 10 minutos a 25 C. Em seguida as lâminas foram incubadas em etanol (70-100%) por 2 minutos a 25 C e secas por 10 minutos a

25°C. Após a secagem, os cortes foram incubados com a sonda ZytoDot SPEC-CMYC Probe (Cód.C-3013-400\_ZytoVision) (Tabela 3) por 6 minutos a 96°C seguido de hibridização a 37°C *overnight* em hibridizador (Hybridization oven/shaker-RPM2510E\_Amersham Biosciences). Após a hibridização, os cortes de tecido foram lavados em tampão 0,5X SSC (Cód.WB-0001-500\_ZytoVision) a 25°C, seguido de tampão 0,5X SSC por 5 minutos a 75°C e, finalmente, em água deionizada (3x2 minutos). Na sequência as lâminas foram mergulhadas em solução 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cód.311784\_Nuclear) por 10 minutos e em tampão PBS/tween20 (Cód.F003-MI1\_ZytoVision), 3x2 minutos. Os tecidos foram incubados em solução de bloqueio (Cód.BS-0001-4\_ZytoVision) por 10 minutos a 25°C e depois incubados com anticorpo de camundongo anti-digoxigenina (Cód.AB-0001-4\_ZytoVision) por 30 minutos a 25°C. Após isto os cortes foram incubados com anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (Cód.Ab-0002-4\_Zytovision) por 30 minutos a 25°C e com uma solução de Diaminobenzidina (DAB) (Cód.SB-0001a-0.3\_ZytoVision) por 30 minutos e solução para DAB (Cód.SB-0001b-2\_ZytoVision) por 30 minutos. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina (Cód.S21-MJ1\_ZytoVision) por 10 segundos e montadas para análise em microscopia de campo luminoso (TANNER et al., 2000).

**Critérios de Interpretação:** a análise dos cortes tissulares da hibridização cromógena *in situ* foi realizada através de microscopia de campo luminoso (*Nikon, Eclipse-50i USA*) na objetiva do 40x. Os tumores foram classificados em *não amplificados* quando mais de 50% dos núcleos apresentavam um número de 1 a 5 cópias do gene. *Baixa amplificação:* quando mais de 50% dos núcleos apresentavam um número de 6 a 10 cópias do gene por núcleo. *Amplificados:* quando mais de 50% dos núcleos apresentavam número de cópias do gene maior do que dez ou quando se observava nos núcleos região homogênea de coloração em mais de 50% dos mesmos. Como descrito por TANNER et al., (2000).

**Tabela 03.** Sondas utilizadas na realização da hibridização *in situ* Cromógena nos espécimes do estudo.

<b>Sonda</b>	<b>Empresa</b>	<b>Locus</b>	<b>Volume de uso</b>	<b>Controle Positivo</b>
<b>Her-2</b>	ZytoVision, Germany	17q12	10µl	Tecido humano não neoplásico
<b>c-myc</b>	ZytoVision, Germany	8q24	10µl	Linfonodo humano não neoplásico

*Her-2: Gene do Receptor para o fator de crescimento epidérmico humano 2. C-myc: Gene de mielocitomatose celular.*

**Análise Digital de Imagens:** para analisar as amostras submetidas à técnica imunohistoquímica foi utilizado um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico Eclipse 50i (*Nikon, Eclipse-50i USA*). Foram analisadas áreas aleatórias ( $\mu\text{m}^2$ ) e número de células marcadas por área. A análise quantitativa das células das marcadas será aferida utilizando sistema automático, estudando-se três áreas em cada caso.

**Análise estatística:** os dados da caracterização dos carcinomas ductais invasivos foram descritos utilizando seus valores absolutos e relativos e expressos na forma de gráficos e tabelas. Também, a análise da correlação entre os dados clínico-patológicos das amostras dos tumores de mama e os resultados imunohistoquímicos dos biomarcadores estudados foram realizados através do teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e/ou teste exato de Fischer utilizando o programa computacional *Prism 5 for Windows* (GraphPad Prism 5.0). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .

**Aspectos éticos:** o presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (CAAE 06586612.9.0000.5208–Parecer No. 140.876 em 07/11/2012).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil imunohistoquímico da população de CDI mamário estudada quanto à sua distribuição entre todos os subtipos moleculares mostrou maiores frequências entre o luminal A (36,7%) e o triplo negativo (40%). Estes resultados foram semelhantes a um estudo de base populacional realizado com mais de 10 mil mulheres, a partir de dados de registros de câncer em vários países da América do Norte, Europa e Austrália, que demonstrou o subtipo luminal A (71,3%) e o triplo negativo (16%) eram os mais frequente entre os outros tipos de tumores (BLOWS et al., 2010).

Dentre os resultados encontrados quanto aos dados clínicopatológicos dos subtipos moleculares de CDI avaliados destacamos que a idade média das pacientes ao diagnóstico foi de 53,34 anos. Esse resultado está de acordo com que a idade média encontrada em outros estudos na população brasileira que foi respectivamente, de 54,0 e 56,4 anos (MORAES et al., 2006; GUERRA; GULNAR; BUSTAMANTE-TEIXEIRA, 2009).

A frequência absoluta entre todos os pacientes com idade  $\leq 50$  e  $>50$  correspondeu a 50% (30/60). O tamanho do tumor ao diagnóstico  $\leq 5$ cm e  $>5$ cm foi 39 (65%) e 21 (35%). O grau histológico I e II correspondeu a 26 (43,30%) e III 34 (56,70%). Quarenta e três pacientes (71,7%) eram positivos e 17 (28,30%) eram negativos para comprometimento linfonodal. O grau nuclear 1 e 2 correspondeu 22 (36,70%) e 38 (63,30%) correspondeu ao grau 3 respectivamente (Tabela 4).

Com relação à idade ao diagnóstico (Tabela 4) observou-se neste estudo que as pacientes com tumores triplo-negativo apresentaram alta prevalência (62,5%) de idade  $\leq 50$  anos ao diagnóstico. Não sendo verificada diferenças estatisticamente significantes para idade entre cada grupo de tumor ( $p = 0,4356$ ). Esses resultados não diferem dos observado em outros estudos, que tem reportado, o predomínio de tumores triplo negativo entre as pacientes mais jovens exibindo doença mais avançada ao diagnóstico e com índices de proliferação celular mais elevado CAREY et al., 2006; KWAN et al., 2009; CORREA et al., 2010).

O maior percentil de tumores com tamanho  $\leq 5,0$ cm ao diagnóstico foi encontrado no subtipo luminal A (86,4%) e luminal B (83,3%) ( $p = 0,0159$ )

respectivamente (Tabela 4). Também foi observado que subtipo luminal A (68,2%), destacou-se por apresentar menor grau histológico I/II ( $p=0,0135$ ) em relação aos outros subtipos de tumores (Tabela 4). O grau nuclear 1 e 2 também foi mais prevalente (54,5%) para os luminais A ( $p=0,1028$ ) (Tabela 4). Uma relativa associação prognóstica favorável foi observada com relação ao grau tumoral e nuclear. Para ambos os parâmetros (graus histológicos e nuclear) se verificou um aumentando das chances desses tumores apresentarem graus histológicos entre I ou II ( $p=0,006$ ) e nuclear entre 1 e 2 ( $p=0,0504$ ) respectivamente, o que pode ser utilizado para inferir as características prognósticas dos tumores luminais (Tabela 5). Esses resultados estão de acordo com estudo que mostrou características significativamente favoráveis entre os tumores luminal A e B, tumores diferenciados com baixo a moderado grau histológico, e estadio precoce ao diagnóstico (IRIGOYEN et al., 2011).

**Tabela 04:** Distribuição dos parâmetros clínico-patológicos entre cada subtipo molecular de CDI de mama.

Característica clínicopatológicas	Luminal A		Luminal B		HER-2		Triplo negativo		$p^*$
	n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Idade (anos)</b>									
≤50	9	41	3	50	3	37,5	15	62,5	0,4356
>50	13	59	3	50	5	62,5	9	37,5	
<b>Tamanho (cm)</b>									
≤ 5	19	86,4	5	83,3	3	37,5	12	50	<b>0,0159</b>
>5	3	13,6	1	16,7	5	62,5	12	50	
<b>Grau histológico</b>									
I/II	15	68,2	1	16,7	1	12,5	9	37,5	<b>0,0135</b>
III	7	31,8	5	83,3	7	87,5	15	62,5	
<b>Status linfonodal</b>									
Positivo	15	68,2	4	66,7	7	87,5	17	70,8	0,7527
Negativo	7	31,8	2	33,3	1	12,5	7	29,2	
<b>Grau nuclear</b>									
1 e 2	12	54,5	1	16,7	1	12,5	8	33,3	0,1028
3	10	45,5	5	83,3	7	87,5	16	66,7	

\*Teste de qui-Quadrado

**Tabela 05.** Distribuição dos parâmetros clínico-patológicos entre cada subtipo molecular de câncer de mama em relação ao agrupamento dos outros subtipos

Subtipo Molecular		Idade (anos)				<i>p</i> **	OR (IC95%)
		≤50		>50			
		n	%	n	%		
Luminal A	+	9	40,9	13	59,1	0,4220**	0.5604
	-	21	55,3	17	44,7		0.1934-1.624
Luminal B	+	3	50,0	3	50,0	1.000**	1.000
	-	27	50,0	27	50,0		0.1850-5.405
Superexpressão de HER-2	+	2	25,0	6	75,0	0,700**	0,5789
	-	19	36,5	33	63,5		0.1060-3.161
Triplo-negativo	+	8	33,3	16	66,6	1,000**	0,8846
	-	13	36,1	23	63,9		0.2981-2.625

Subtipo Molecular		Tamanho tumor (cm)				<i>p</i> **	OR(IC95%)
		≤5		>5			
		n	%	n	%		
Luminal A	+	19	86,4	3	13,6	<b>0,0112**</b>	5.700
	-	20	52,6	18	47,4		1.442-22.53
Luminal B	+	4	66,6	2	33,3	0,2199**	2,902
	-	17	31,5	37	68,5		0.5837-14.43
Superexpressão de HER-2	+	3	37,5	5	62,5	0,0853**	0,1778
	-	36	69,2	16	30,8		0.03112-1.016
Triplo-negativo	+	12	50,0	12	50,0	<b>0,0578**</b>	0,3333
	-	27	75,0	9	25,0		0.1110-1.001

Subtipo Molecular		Grau Histológico				<i>p</i> **	OR(IC95%)
		I/II		III			
		n	%	n	%		
Luminal A	+	15	68,2	7	31,8	<b>0.006**</b>	5,260
	-	11	29,0	27	71,0		1.684-16.43
Luminal B	+	1	16,7	5	83,3	0,2206	0,2320
	-	25	46,3	29	53,7		0.02537-2.122
Superexpressão de HER-2	+	1	12,5	7	87,5	<b>0,0570**</b>	0,1323
	-	25	48,1	27	51,9		0.01517-1.153
Triplo-negativo	+	9	37,5	15	62,5	0,5960**	0,6706
	-	17	47,2	19	52,7		0.2336-1.925

Subtipo Molecular		Status linfonodal				<i>p</i> **	OR (IC95%)
		Sim		Não			
		n	%	n	%		

Luminal A	+	15	68,2	7	31,8	0,7681**	0.7653 (0.241- 2.422)
	-	28	73,7	10	26,3		
Luminal B	+	4	66,7	2	33,3	1.000**	0,7692 0.1272- 4.650
	-	39	72,2	15	27,3		
Superexpressão de HER-2	+	7	87,5	1	12,5	0,4201**	3,111 0.3527- 27.44
	-	36	69,2	16	30,8		
Triplo-negativo	+	17	70,8	7	29,2	0,5592**	1,518 0.4650- 4.955
	-	26	72,2	10	27,8		
<b>Grau Nuclear</b>							
Subtipo Molecular		Grau Nuclear				$p^{**}$	OR (IC95%)
		1 / 2		3			
		n	%	n	%		
Luminal A	+	12	54,5	10	45,4	<b>0.0504**</b>	3.360 (1.077-3.990)
	-	10	26,3	28	73,7		
Luminal B	+	1	16,7	5	83,3	0,3999**	0,3143 0.03426- 2.883
	-	21	38,9	33	61,1		
Superexpressão de HER-2	+	1	12,5	7	87,5	0,2376**	0,2109 0.02413- 1.843
	-	21	40,4	31	59,6		
Triplo-negativo	+	8	33,3	16	66,7	0,7865**	0,7857 0.2664- 2.317
	-	14	38,9	22	61,1		

\*Teste exato de Fisher. \*Teste de qui-Quadrado. Estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ )

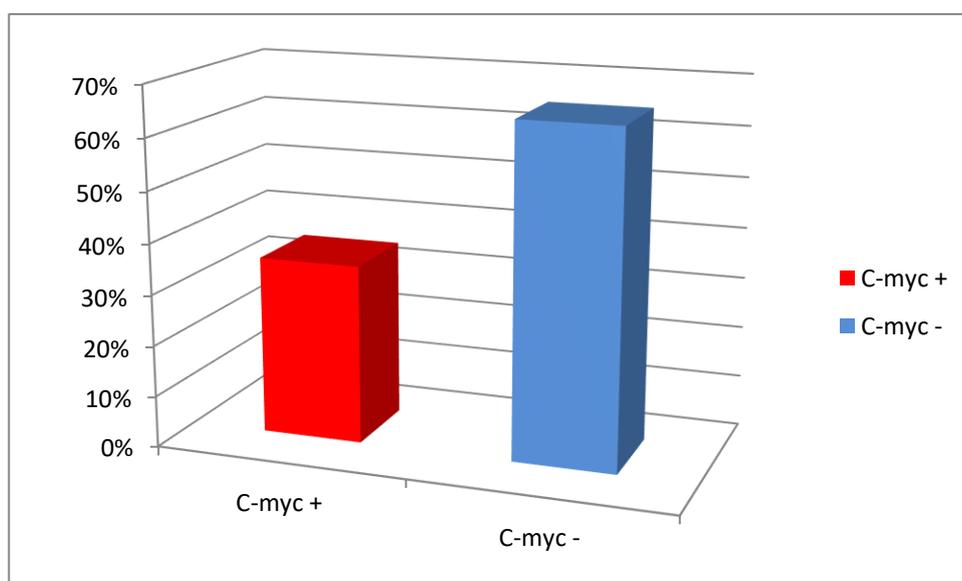
O nível de comprometimento linfonodal entre os subtipos moleculares foi avaliado. Destacaram-se os tumores superexpressão de HER-2, 87,5% (7/8), triplo-negativo 70,8% (17/24) com maiores taxas de positividade para invasão de linfonodos regionais seguido de luminal A 68,2% (15/22) e luminal B 66,7% (4/6). Contudo, não foi observada diferença estatisticamente significante entre os eles ( $p = 0,7527$ ) (Tabela 4). Para os superexpressão de HER-2 um relativo aumento das chances das pacientes terem tumores mais indiferenciados (Grau III) foi observado. Impactando de maneira negativa no prognóstico ( $p=0,0570$ ) dos pacientes (Tabela 5). Estes resultados coincidem com outros estudos nos quais os carcinomas superexpressão de HER-2 e triplo negativo apresentam-se com as características clínico-patológicas mais desanimadoras comparados aos luminais (HUANG, NEWMAN, MILLIKAN, 2000; KREIKE et al., 2007)

O câncer de mama é uma afecção que apresenta um comportamento clínico heterogêneo. Sabe-se que os resultados clínicos dos pacientes dependem

dos diferentes parâmetros clínico-patológicos, incluindo, grau histológico, tamanho do tumor, status linfonodal e subtipo histológico. Contudo, outros parâmetros como, por exemplo, alguns marcadores moleculares podem auxiliar na seleção de pacientes para terapia adjuvante. Estes marcadores são definidores para estratificação de populações “uniformes” em subpopulações definidas para que as terapias oferecidas a estes grupos sejam reflexo de suas verdadeiras necessidades terapêuticas (HAMILTON; PICCART, 2000).

A técnica de Hibridização *in situ* se baseia na propriedade da complementariedade das bases nitrogenadas. A CISH quando comparada a outras técnicas (Southern blotting e PCR; a hibridização *in situ* apresenta certas vantagens (SQUIRE et al., 1996). Permite análise concomitante das características morfológicas dos tumores, número de células e heterogeneidade intratumoral do número de cópias gênicas (LAMBROS; NATRAJAN; REIS-FILHO, 2007).

Em nosso estudo, uma frequência de 35% de amplificação do gene *c-myc* foi observada nos pacientes (Figura 1). Aulmann et al., (2006) demonstrou resultados similares (22%). Deming et al., (2000) observou uma frequência menor de amplificação (15,7%) em seu estudo. Recentemente, Yasojma et al., (2011) observou um índice de positividade de 40%.



**Figura 01:** Frequência de amplificação do gene *c-myc* entre pacientes portadoras de carcinoma invasivo da mama.

A frequência de amplificação do gene *c-myc* entre os parâmetros clínico-patológicos são apresentados na tabela 6. A maioria dos pacientes com amplificação de *c-myc* (66,7%) apresentavam tumores indiferenciados (grau histológico III) ao diagnóstico. Aproximadamente 86% dos pacientes com amplificação apresentavam comprometimento de linfonodos regionais ao diagnóstico. E 71,4% tinham grau nuclear 3. Contudo, não foi observado diferenças estatisticamente significantes entre todos os parâmetros analisados e amplificação. Estudos têm reportado que a amplificação de *c-myc* afeta o prognóstico de vários tumores. Visto que tumores apresentados desregulação do gene apresentam maior nível de metástase em linfonodos menores taxas de sobrevida livre de doença (HWANG et al., 2015; LEBOK et al., 2015).

**Tabela 06:** Distribuição dos parâmetros clínico-patológicos entre cada subtipo molecular de CDI de mama.

Variáveis clínicopatológicas	Amplificação de <i>c-myc</i>				p*
	Positivo		Negativo		
	n	%	n	%	
Idade (anos)					
≤50	8	38,1	22	56,4	0,2789
>50	13	61,9	17	43,6	
Tamanho (cm)					
≤ 5	13	61,9	26	66,7	0,7803
>5	8	38,1	13	33,3	
Grau histológico					
I/II	7	33,3	19	48,7	0,2866
III	14	66,7	20	51,3	
Status linfonodal					
Positivo	18	85,7	25	64,1	0,1318
Negativo	3	14,3	14	35,9	
Grau nuclear					
1 e 2	6	28,6	16	41	0,4079
3	15	71,4	23	59	

\*Teste de qui-Quadrado. Estatisticamente significativa  $p \leq 0,05$ )

A frequência de amplificação do *c-myc* entre os tumores foi: luminal A (31,8%), luminal B (66,7%), HER-2 (25%) e o triplo negativo (33,3%). Não foram

observadas diferenças estatisticamente significantes entre tumores com e sem amplificação e entre os subtipos moleculares ( $p=0.3730$ ) (tabela 7).

**Tabela 07.** Frequência de amplificação de *c-myc* nos subtipos moleculares de câncer de mama.

Subtipos Moleculares	Amplificação de <i>c-myc</i>		$p^*$
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Luminal A	7 (31,8%)	15 (68,2%)	0.3730
Luminal B	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
Superexpressão de Her-2	2 (25,0%)	6 (75,0%)	
Triplo negativo	8 (33,3%)	16 (66,7%)	

\*Teste de qui-quadrado. Estatisticamente significativa  $p \leq 0,05$

A análise da distribuição de amplificação do *c-myc* comparada entre cada subtipo intrínseco de tumor de mama encontram-se descritos na tabela 8. A comparação entre cada grupo de individualmente revelou não haver diferença estatisticamente significativas entre os pare analisados.

**Tabela 08.** Frequência de amplificação do gene *c-myc* detectado por CISH, entre cada subtipo molecular de câncer de mama em relação ao agrupamento dos outros subtipos.

Subtipos Moleculares	Categorias	Amplificação de <i>c-myc</i>				$p^*$
		Sim		Não		
		n	%	n	%	
Luminal A	+	7	31,8	15	68,2	0,783
	-	14	36,8	24	63,2	
Luminal B	+	4	66,7	2	33,3	0,170
	-	17	31,5	37	68,5	
Superexpressão de Her-2	+	2	25,0	6	75,0	0,700
	-	19	36,5	33	63,5	
Triplo-negativo	+	8	33,3	16	66,6	1,000
	-	13	36,1	23	63,9	

\*Teste de qui-square ou Fisher's exact. Estatisticamente significativa  $p \leq 0,05$ )

Nossos resultados não apresentaram diferença significativa quando se comparou amostras de CDI amplificadas para *c-myc* e as não-amplificadas.

Atualmente, tal inferência pode ser igualmente observada em diversos estudos (PEREZ et al., 2011; YASOJIMA et al., 2011).

## CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que os subtipos moleculares mais prevalentes foram luminal A e B, respectivamente. Esses subtipos moleculares de CDI mostraram características clínico-patológicas com prognósticos favoráveis, exibindo tumores diferenciados com baixo a moderado graus histológico e nuclear ao diagnóstico. Tumores superexpressão de HER-2 e triplo-negativo se relacionaram com características prognósticas desfavoráveis. Mostrando maiores taxas de positividade para invasão de linfonodos regionais. Maiores chances de tumores pouco diferenciados e um predomínio de diagnóstico entre as pacientes mais jovens respectivamente. Maior frequência de amplificação do *c-myc* esteve presente no subtipo triplo negativo. Indicando que a amplificação pode está associada com esteve associada a tumores mais agressivos. Uma vez que a amplificação deste oncogene foi encontrada com maior frequência em tumores que apresentaram parâmetros clínico-patológicos desfavoráveis.

## REFERÊNCIAS

Abreu E, Kioifman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Rev Bras Cancerol* 2002;48:113-31.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society; 2015.

Anders CK, Acharya CR, Hsu DS, Broadwater G, Garman K, Foekens JA, et al. Age-specific differences in oncogenic pathway deregulation seen in human breast tumors. *PLoS ONE* 2008;3:1373.

Aulmann S, Adler N, Rom J, Helmchen B, Schirmacher P, Sinn H P. *c-myc* amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences. *J Clin Pathol* 2006;59:424–428.

Barsyte-Lovejoy D, Lau SK, Boutros PC, Khosravi F, Jurisica I, Andrulis IL, et al. The *c-Myc* oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res* 2006;66:5330–5337.

Bizari L, Silva AE, Tajara EH. Gene amplification in carcinogenesis. *Genet Mol Biol* 2006;29:1-7.

Blancato J, Singh B, Liu A, Liao DJ, Dickson RB. Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer* 2004;90:1612-1619.

Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J *et al.* Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *Plos Med.* 2010;7(5):e1000279.

Bouchalova K, Cizkova M, Cwiertka K, Trojanec R, Hajduch M. Triple negative breast cancer- current status and prospective targeted treatment based on HER1 (EGFR), TOP2A and C-MYC gene assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2009;153:13-7.

Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, *et al.* Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol* 1999;187:396-402.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006;295(21):2492-502.

Choschzick M, Lassen P, Lebeau A, Marx AH, Terracciano L, Heilenkötter U, *et al.* Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. *Mod Pathol* 2010;23:603-10.

Cingoz S, Altungoz O, Canda T, Saydam S, Aksakoglu G, Sakizli M. DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization and their association with clinicopathologic parameters in breast tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;145:108-14

Cintra DRJ, Guerra RM, Bustamante-Teixeira TM. Sobrevida específica de pacientes com câncer de mama não-metastático submetidas à quimioterapia adjuvante. *Rev Assoc Med Bras* 2008;54:339-46

Correa PB, Toralles MBP, Abe-Sandes K, Machado TMB, Bonfim TM. Cancer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana. *Rev Ci Med Biol.* 2010;9(Supl1):3-7.

De la Rochefordiere A, Asselain B, Campana F, Scholl SM, Fenton J, *et al.* Age as prognostic factor in premenopausal breast carcinoma. *Lancet* 1993;341:1039-1043.

Moraes, Anaelena Bragança de, *et al.* "Estudo da sobrevida de pacientes com câncer de mama atendidas no hospital da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil." *Cadernos de Saúde Pública* 22.10 (2006): 2219-2228..

Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock, BJ. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *British Journal of Cancer* 2000;83:1688-1695.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on cancer: the 7<sup>th</sup> edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471-74.

El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK, Charafeddine M, Salem ZK, *et al.* Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer* 2006;6:194.

Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spyrtos F, Champeme MH, Gest J, *et al.* Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:4834-8.

Ferreira, S.A. Vasconcelos, J.L.A. Cavalcanti, C.L.B. Silva, R.C.W.C. Bezerra, C.L. Rêgo, M.J.B.M. Beltrão, E.I.C. Expression patterns of  $\alpha$ 2,3-Sialyltransferase I and  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase I in human cutaneous epithelial lesions. *Eur J Histochem.* v. 57, n.1, p. 41-45, 2013.

GLOBOCAN 2015 (IARC) Section of Cancer Information, acesso em 25 de Jan. de 2015. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011

GOLDHIRSCH, A *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology.* v.24, n.9 , p. 2206-2223, 2013.

Haas JS, Phillips KA, Liang SY, Hasset MJ, Keohane C, Elkin EB, *et al.* Genomic testing and therapies for breast cancer in clinical practice. *Am J Manag Care* 2011;17:e174-81.

HAMILTON A, PICCART M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2. *Ann Oncol* 2000;11:647-63.

HAMMOND, M.E.H *et al.* ASCO-CAP Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* v 28, n.16,p2784-2795,2010.

HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.

Hansel DE, Swain E, Dreicer R, Tubbs RR. HER2 overexpression and amplification in urothelial carcinoma of the bladder is associated with MYC coamplification in a subset of cases. *Am J Clin Pathol* 2008;130:274-81.

Hollis K, Isola J. Effect of age on the survival of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 1997;33:425–428.

Huang W, Newman B, Millikan R. Risk of breast cancer according to the status of HER-2/neu oncogen amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 65-71.

Hwang, D.H et al, Myc protein expression correlates with MYC amplification in small-cell lung carcinoma. *Histopathology*. v. 67,p.81–89, 2015.

Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde, 2016. Estimativas da incidência de câncer no Brasil 2016. Rio de Janeiro:INCA.

Ismail MF, Aly MS, Khaled HM, Mohamed HM. Detection of HER-2/neu, c-myc amplicafication and p53 inactivation by FISH in Egyptian patients wint breast cancer. *German Medical Science* 2009;7:1-9.

Jahanzeb M. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2008; 8:324-33.

Kaltz-Wittmer C, Klenk U, Glaessgen A, Aust DE, Diebold J, Löhns U, *et al*. FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1 ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. *Lab Invest* 2000; 80:1455-64.

Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW. Early-onset breast cancer histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer* 1997;75:1318–1323.

Korshunov A, Remke M, Werft W, Benner, A, Ryzhova M, Witt H, *et al*. Adult and pediatric medulloblastomas are genetically distinct and require different algorithms for molecular risk stratification. *J Clin Oncol* 2010;28:p.3054-60.

Kreike B, van Kouwenhove M, Hurlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H *et al*. Gene expression. profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res*. 2007; 9: R65.

Kwan ML, Kushi LH, Weltzien E, Maring B, Kutner SE, Fulton RS *et al*. *Epidemiology*

Lambros MB, Natrajan R, Reis-Filho JS. Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer. *Hum Pathol* 2007;38:1105-22.

Lambros MB, Simpson PT, Jones C, Natrajan R, Westbury C, Steele D, *et al*. Unlocking pathology archives for molecular genetic studies: a reliable method to

generate probes for chromogenic and fluorescent in situ hybridization. *Lab Invest* 2006; 86:398-408.

Lebok, P et al. Partial PTEN deletion is linked to poor prognosis in breast cancer. *BMC Cancer*. v.15, n.963, p. 1-10, 2015.

Letessier A, Sircoulomb F, Ginestier C, Cervera N, Monville F, Gelsi-Boyer V, et al. Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers. *BMC Cancer* 2006;6:245.

Leyland-Jones B. Trastuzumab: hopes and realities. *The Lanc Oncol* 2002;3:137–144.

Liao DJ, Dickson R. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2000;7:143–164.

Lopez-Garcia, M. A; Geyer, F. C.; Lacroix-Triki, M.; Marchió, C.; Reis-Filho, J. S. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology*, v. 57, n. 2, p. 171-92, 2010.

Irigoyen M.A.A, García F.V, Córdoba-Iturriagagoitia A., Ibáñez B.B., M. Santamaría M., Grima F.G. Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics. *An. Sist. Sanit. Navar.* v,34. n, 2. 2011.

Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with myc. *Nature* 2008;8:976-990.

Myllykangas S, Böhling T, Knuutila S. Specificity, selection and significance of gene amplifications in cancer. *Semin Cancer Biol* 2007; 17:42-55.

Peng CH, Liao CT, Peng SC, Chen YJ, Cheng AJ, Juang JL, et al. A novel molecular signature identified by systems genetics approach predicts prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2011;6:e23452.

PEREZ EA, JENKINS RB, DUECK AC, WIKTOR AE, BEDROSKE PP, ANDERSON SK, et al, C-MYC alterations and association with patient outcome in early-stage HER2-positive breast cancer from the north central cancer treatment group N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol* 2011;29:651-9.

Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 2011;16 Suppl 1:61-70.

Ribeiro HF, Alcântara DF, Matos LA, Sousa JM, Leal MF, Smith MA, et al. Cytogenetic characterization and evaluation of c-MYC gene amplification in PG100, a new Brazilian gastric cancer cell line. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43:717-21.

Rodriguez-Pinilla SM, Jones RL, Lambros MBK, Arriola E, Savage K, James M, *et al.* MYC amplification in breast cancer: a chromogenic *in situ* hybridisation study. *J Clin Pathol* 2007;60:1017–1023.

Rummukainen JK, Salminen T, Lundin J, Joensuu H, Isola JJ, *et al.*, Amplification of c-myc oncogene by chromogenic and fluorescence *in situ* hybridization in archival breast cancer tissue array samples. *Lab Invest* 2001;81:1545–1551.b

Sato H, Minei S, Hachiya T, Yoshida T, Takimoto Y. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of c-myc amplification in stage TNM prostate cancer in Japanese patients. *Int J Urol* 2006;13:761-6.

Schulz WA. Breast Cancer. In: SCHULZ, WA. *Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook*. Netherlands: Springer, 2007. p. 357-382.

Simpson, P.T.; Reis-Filho, J.S. Gale, T.; Lakhani, S.R. Molecular evolution of breast cancer. *The Journal of pathology*, v. 205, n. 2, p. 248-54, 2005.

Singer CF, Köstler WJ, Hudelist G. Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: current standards and future strategies. *Biochim Biophys Acta* 2008 ;1786:105-13.

Tirkkonen, M.; Tanner, M.; Karhu, R.; Kallioniemi, A.; Isola, J.; Kallioniemi, O.P. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*. v.21,p.177-84, 1998.

Todorović-Raković N, Nešković-Konstantinović Z, Nikolić-Vukosavljević D. C-myc as a predictive marker for chemotherapy in metastatic breast cancer. *Clin Exp Med* 2011.

Varmus HE. The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu Rev Genet* 1984;18:553-612.

Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16:318-30.

Welm AL, Kim S, Welm BE, Bishop JM. MET and MYC cooperate in mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:4324-9.

Wolfer A, Wittner BS, Irimia D, Flavin RJ, Lupien M, Gunawardane, RN, *et al.* MYC regulation of a "poor-prognosis" metastatic cancer cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 107:3698-703.

Wolff, A.C *et al.* Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. v.31, n.31, p. 3997-4013, 2013.

Yasojima H, Shimomura A, Naoi Y, Kishi K, Baba Y, Shimazu K, *et al.* Association between c-myc amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Cancer* 2011;47:1779-88.

Yoder BJ, Wilkinson EJ, Massol NA. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. *The Breast Journal* 2007;13:172-179.

Zitterbart K, Filkova H, Tomasikova L, Necesalova E, Zambo I, Kantorova D, *et al.* Low-level copy number changes of MYC genes have a prognostic impact in medulloblastoma. *J Neurooncol.* 2011;102:25-33.

## 5.2 ARTIGO 2

### **MOLECULAR SUBTYPES OF BREAST CANCER: STUDY OF C-MYC AMPLIFICATION AND EXPRESSION USING CHROMOGENIC IN SITU HYBRIDIZATION AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY METHOD**

Silva-Filho, J.L.Q.<sup>1</sup>, Vasconcelos, J.L.A.<sup>1</sup>, Ferreira, A.S.<sup>1</sup>, Nascimento, J.C.F.<sup>1</sup>, Cavalcanti, C.L.B.<sup>1</sup>, Beltrão, E.I.C.<sup>1,2</sup>

1 Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

2 Departamento de Bioquímica – Centro de Biociências (CBC) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Correspondence: Eduardo Beltrão. LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – CDU, Recife, PE – Brasil. 50670-901. E-mail: ebeltrao@hotmail.com

Research supported by CNPq and FACEPE.

## ABSTRACT

**Background:** Breast cancer is the second most common cancer worldwide among women, accounting for 25% of all female cancers. In Brazil, it is the most incident cancer in women. The study of some markers may help the understanding of disease progression, as well as planning the most appropriate therapy. *C-myc* gene is involved in cell differentiation, apoptosis, angiogenesis and immortalization, playing central role in the tumorigenic process and its amplification is associated with invasive ductal carcinomas (IDC). This study aimed to evaluate *c-myc* amplification and its expression prein using chromogenic *in situ* hybridization (CISH) and immunohistochemistry to correlate these molecular markers with clinicopathological features. **Materials and Methods:** A retrospective analysis of breast cancer subtypes, age, tumor status nodal, staging pathological, histopathological and nuclear grading of 60 cases. The estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor-2 (HER2), and Ki-67 of tumor samples were all investigated by immunohistochemistry according to the methods used to classify breast cancer subtypes as proposed in the *St. Gallen Consensus Report*, 2013. To evaluate the *c-myc* copy number and its protein expression, CISH and IHC analyses were performed for breast cancer, in Brazilian. **Results:** The most frequent molecular sub-types of IDC were triple-negative (40%) and Luminal A (37.7%). Luminal A (86,4%) and B (83,3%) sub-types showed to be well differentiated tumours regarding histological grade ( $p=0.0135$ ) and tumors size ( $\leq 5,0\text{cm}$ ) at diagnostic ( $p=0,0159$ ). On the contrary, the types superexpressed HER-2 and triplo nevative carcinomas presented larger ( $p=0.0159$ ) and poorly differentiated tumors ( $p= 0.0570$ ) with linfonodes involvement and advanced stages at the time of diagnosis. We observed *c-myc* oncogene amplification in 21 tumours (35%) and positive protein expression in 46 tumors (76,7%). No statistical difference between amplified and non-amplified and positive and negative molecular subtypes of IDC was found. **Conclusion:** A better understanding of tumors behavior of *c-myc* amplification and protein expression and its clinical impact, combined with other molecular parameters, will help to stratify patients into risk groups and to conduct more targeted therapies.

**Key Words:** Breast cancer, *c-myc*, gene amplification, expression, chromogenic *in situ* hybridization, immunohistochemistry.

## INTRODUCTION

Breast cancer is the second most frequent type of cancer in the world. It is the most common cancer in feminine gender, corresponding to 25% of women cancer cases.<sup>1,2</sup> In Brazil, it was estimated that 600 mil cancer cases will be detected in 2016, of which 57.690 will be breast cancer.<sup>3</sup>

Breast cancer etiology is unknown; nevertheless, some risk factors such as precocious menarche, late menopause, nulliparity, women age in their first gestation, contraceptive use, hormonal reposition therapy, exposition to ionizing radiation and genetic predisposition could be involved with the disease development.<sup>4</sup>

Usually, invasive ductal carcinoma has an aggressive clinic behavior and variations in therapeutic responses depending of staging as well as presence or absence of the expression certain biomarkers.<sup>4,5,6</sup>

Numerical and structural alterations in chromosome 8 have been commonly detected in breast cancer<sup>7,8,9</sup> and in others tumors types.<sup>10,11,12</sup> The majority of these modifications occur as low level changes in copies numbers, including complete or partial deletions in 8p and gains in 8q chromosome arms.<sup>13,14</sup> High amplification levels have been found not only in 8q24 but in other regions of 8 chromosome, as 8p12 and 8q21.<sup>15,16,17</sup>

Gene amplification is an important mechanism for protein overexpression as well as for oncogenes activation in cancer.<sup>18</sup> *C-myc* proto-oncogene (homolog to *v-myc* viral oncogene which causes bird myelocytomatosis), situated in 8 chromosome long arm<sup>19</sup>, is generally an amplification target.<sup>20</sup> The amplification can be visualized as double minutes (DM) and/or homogeneous staining region (HSR).<sup>21</sup> *C-myc* gene product is a transcription factor involved in cell proliferation, division, growth, metabolism, differentiation and apoptosis. Deregulation of *c-myc* gene can induces carcinogenesis by genomic instability, cell proliferation control, escape from immune system surveillance and immortalization.<sup>22,23</sup>

Amplification and/or overexpression of *c-myc* oncogene has been detected in different neoplasies, including breast cancer.<sup>24-31</sup> In breast tumors, *c-myc* amplification frequency, mRNA and protein overexpression vary from 1 to 94%, 22 to 95% and 50 to 100% respectively.<sup>32,33</sup> In spite of these data, *c-myc* amplification

frequency is not so evident, which variation depends on the type of the studies and the employed technique.<sup>34</sup>

Unlike *HER-2* oncogene amplification and overexpression, which already exists a consensus with regard to its clinic application and its therapeutic impact.<sup>35,36,37</sup>, *c-myc* amplification pattern is not well established to diagnostic and therapeutic uses. Some studies demonstrated that *c-myc* amplification is associated with more aggressive phenotypes<sup>38</sup> and poor prognosis in the presence of molecular marker.<sup>39,26,29</sup>

Nowadays, some groups are studying the use of *c-myc* in association with others biomarkers to evaluate therapeutic response<sup>29</sup> as well as tumor stratification in different risk groups<sup>26</sup>, which, illustrates the relevant role of *c-myc* gene in breast cancer. This study aimed to evaluate *c-myc* amplification and its expression prein using chromogenic *in situ* hybridization (CISH) and immunohistochemistry to correlate these molecular markers with clinicopathological features.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients**

Sixty formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies diagnosed as invasive ductal carcinoma (IDC) were obtained from Anatomy Pathology Service of Hospital das Clínicas at Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil. This study was approved by the Health Science Center Bioethical Board of UFPE (CAAE 06586612.9.0000.5208, CEP/CCS/UFPE No.140.876). Eligibility criteria for this study were a: histologically confirmed IDC; b: adequacy of clinical data on patient's history, tumor characteristics and c: availability of adequate FFPE tumor tissue for biological marker evaluation. Clinical and pathological parameters such as: age, tumor size, lymph node invasion, grade histological and stage were evaluated.

### **Immunohistochemistry**

Tumor sections (4- $\mu$ m thick) of formalin-fixed, paraffin-embedded were deparaffinized in xylene and dehydrated in graded alcohol. Antigens were retrieved by heating slides in a steamer in citrate buffer (pH 6) at boiling temperature, for 30

minutes. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide in PBS. Sections were incubated for 1 hour at room temperature with a protein-blocking solution consisting of PBS containing 1% normal goat serum and then incubated with the appropriate dilution of primary antibody: C-myc (1:50, 9E10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), ER (1:50, L20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), PR (1:50, AB-52; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), HER-2 (1:100, CB11; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), Ki-67 (1:50, Ki-67; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) overnight at 4°C in humidity chamber. Sections were incubated with biotin-free polymer (ADVANCETM HRP KIT, DAKO, Carpinteria, CA, USA). According manufacture instructions, samples were incubated with ADVANCETM HRP LINK (containing secondary antibodies) for 45 minutes and then with ADVANCETM HRP Enzyme (containing antibodies conjugated to horseradish peroxidase, HRP) for 45 minutes. Immunocomplexes were visualized with stable 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). The sections were rinsed with distilled water and counterstained with hematoxylin for 10 seconds.

### **Scoring Immunohistochemistry**

Tissues were analyzed using an image system coupled to an Eclipse 50i microscope (Nikon, Melville, New York). Regardless of the strength of stain, any color of the nucleus (with/without staining of the cytoplasm) was assumed as positive. If 10% or more of the tumor cells were positive for MYC protein, the patient was considered as MYC positive.<sup>40</sup> The estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) expression analyzes were conducted following the recommendations of the ASCO/CAP ER/PR guidelines (2010) (HAMMOND et al., 2010)<sup>41</sup> and HER-2 expression was evaluated according to the ASCO/CAP HER2 guideline (2013). Cromogenic *in situ* hybridization was used to assess the number of copies of *HER2* for cases exhibiting 2+ HER2 staining by performing IHC (WOLFF et al., 2013)<sup>42</sup>. Ki67 expression was evaluated according to Cheang and colleagues (2009)<sup>43</sup> and cases were considered positive when more than 14% of neoplastic cells nuclei expressed this protein. According to the criteria suggested by *Consensus St. Gallen* (2013), the cases were classified into four subtypes according to the IHC results: 1) LA (ER- and/or PR-positive, HER2-negative, and

Ki-67 <14%); 2) LB (ER- and/or PR-positive and either HER2- positive or Ki-67  $\geq$ 14%); 3) HE (ER- and PR-negative and HER2-positive); and 4) TN (ER-, PR-, and HER2-negative).<sup>44</sup>

### **Cromogenic *in situ* hybridization**

Formalin-fixed, paraffin embedded IDC samples were cut (4 $\mu$ m) were deparaffinized in xylene and hydrated in graded ethanol (100-70%). Tissue preparation was carried out with tissue Heat Pretreatment solution EDTA Kit in which sample slices were submitted to a tissue pretreatment solution (*Cód.PT-0002-500\_ZytoVision*), previously heated at 98°C, for 15 min. Samples were washed with deionized water and digested by Pepsin solution (*Cód.ES-0001-4\_ZytoVision*) (5 minutes at room temperature). Sample slices were washed three times with deionized water followed by gradual ethanol for dehydration. After air drying, 10 $\mu$ L probe *ZytoDot* CISH SPEC-CMYC or *ZytoDot* CISH SPEC-HER-2 (*ZytoVision*) was added to each sample slice and incubated in a hotplate at 96°C for 6 min and 37°C for 24 hours. After hybridization, samples were washed with 0.5x SSC (*Cód.WB-0001-500\_ZytoVision*) buffer for five minutes at room temperature, followed by additional washer with 0.5x SSC buffer at 75°C for five minutes and three times in deionized water. Samples slices were transferred to a 3% hydrogen peroxide in methanol solution for 10 min followed by three washing steps with 100mM PBS/0.025% Tween20 for 2 minutes. Samples slides were incubated with Block Solution (*Cód.BS-0001-4\_ZytoVision*) for 10 min followed by incubation with mouse anti-Digoxigenin (*Cód.AB-0001-4\_ZytoVision*) primary antibody for 30 minutes. Sample slices were three times washed with 100mM PBS/0.025% Tween20 and incubated with anti-Mouse-HRP- Polymer (*Cód.Ab-0002-4\_Zytovision*) secondary antibody for 30 minutes followed again by three washing steps with 100mM PBS/0.025% Tween20. Signal revealing was achieved by sample slides incubation with DAB (diaminobenzidine) solution (DAB Chromogen Solution, Substrate Buffer, Hydrogen Peroxide - *ZytoDot*<sup>TM</sup>) for 30 minutes. Tissues were counterstained with Hematoxylin. Samples slices were washed in water for two minutes followed by serial ethanol dehydration and two xylene washing steps. Hybridized tissue samples analysis was carried out by optic microscopy using a 40x objective lens. Tumors classifications were: not amplified

(>50% nuclei presented one to five gene copies per nuclei); amplification (>50% nuclei presented six or more gene copies per nuclei).<sup>45</sup>

### Statistical analysis

All Statistical analysis was performed using *GraphPad Prism version 5*. The contingency analysis was used to compare the associations of categorical variables and p values were derived from the methods of chi-square or Fisher exact. The association among amplification and/or expression c-myc and clinic parameters was estimated by calculating the odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI). OR estimate the chance of an event occurring in one group compared to another group.  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS AND DISUSSION

### Clinical results

The clinicopathological patients features are shown in Table 1. Fifty per cent of the patients had  $\leq 50$  years old at diagnosis. The majority, 65% (39/60) had tumor sizes  $\leq 5$ cm. Thirty-four patients (56.70%) had histological grade III tumors. Forty-three (71.1%) were positive for lymph node involvement and 63.30% had nuclear grade 3 (Table 1).

The immunohistochemical profile of the IDC population showed high levels of triple negative (40%) and luminal A (36.7%) tumors It was observed high prevalence (62.5%) of triple-negative tumors in patients with age  $\leq 50$ . There was no statistically significant differences between the molecular subtypes of IDC and the age at diagnosis ( $p=0.4356$ ). Similar results have been reported by other authors. Showing prevalence of triple negative tumors among younger patients and with showing more advanced disease at diagnosis and high cell proliferation.<sup>46-48</sup>

High frequencies of small tumors ( $\leq 5.0$ cm) were found in luminal A (86.4%) and in luminal B (83.3%) IDC molecular subtypes. Revealed statistically significant differences ( $p=0.0159$ ) respectively (Table 1). The luminal A tumors (68.2%) had lower histological grade I/II ( $p=0,0135$ ) when compared to the non-luminal A ones (Table 1). The nuclear grade 1 and 2 was also more prevalent (54.5%) in luminal

A tumors ( $p=0,1028$ ) (Table 1). Similar results have been reported in the literature, Showing that luminal tumors present prognostics poor favorable. Which influence the response to treatment and survival free.<sup>49,50</sup>

**Tabela 01:** Clinicopathological features of IDC patients according to their molecular subtypes.

Variables	Luminal A		Luminal B		HER-2		Triple negative		$p^*$
	n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Idade (years)</b>									
≤50	9	41	3	50	3	37,5	15	62,5	0,4356
>50	13	59	3	50	5	62,5	9	37,5	
<b>Size (cm)</b>									
≤ 5	19	86,4	5	83,3	3	37,5	12	50	<b>0,0159</b>
>5	3	13,6	1	16,7	5	62,5	12	50	
<b>Grade histological</b>									
I/II	15	68,2	1	16,7	1	12,5	9	37,5	<b>0,0135</b>
III	7	31,8	5	83,3	7	87,5	15	62,5	
<b>Status nodal</b>									
Positive	15	68,2	4	66,7	7	87,5	17	70,8	0,7527
Negative	7	31,8	2	33,3	1	12,5	7	29,2	
<b>Grade nuclear</b>									
1 and 2	12	54,5	1	16,7	1	12,5	8	33,3	0,1028
3	10	45,5	5	83,3	7	87,5	16	66,7	

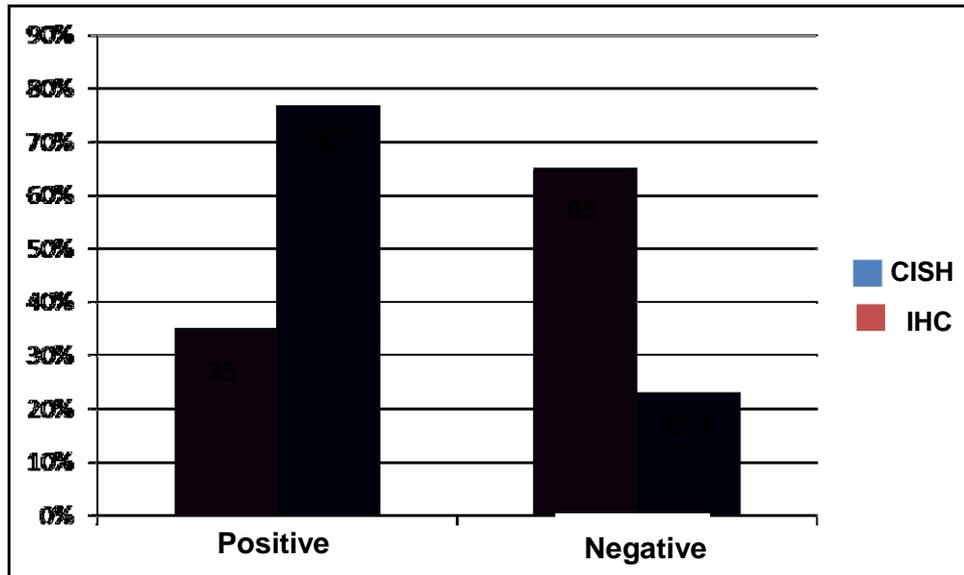
\*Chi-square test.

The tumor size ( $p=0.0159$ ) and the histological grade ( $p=0.0135$ ) showed statistically significant differences between tumors HER-2 and triple negative. Also, high rate of nodal invasion (87.5%) and (70.8%) respectively. But in this study was not observed statistical differences in nodal status ( $p = 0,7527$ ), nuclear grade ( $p=0.1028$ ) and age ( $p=0.4356$ ) (Table 1). In this context, the tumor size is important for diagnosis being used as one of the main parameter in the TNM classification<sup>51</sup> and for the treatment decision in surgical cases and relapse, metastasis and lymph node involvement.<sup>52</sup> Also it has been observed that high IDC grade have the most extensive and complex genetic alterations. These tumors tend to be estrogen receptor (ER) negative, exhibit aneuploidy, high mitotic index and usually overexpression of MYC and HER2.<sup>14,53</sup>

### Chromogenic *in situ* hybridization results

*In situ* Hybridization (chromogenic or fluorescent - CISH and FISH, respectively) is a technic which presents advantages regarding other ones such as southern blotting and traditional histochemistry. These advantages include a long life-time signal that allows the storage of tissue slides, analysis of tumors morphologic features that helps in the diagnosis.<sup>54</sup>

In this study a *c-myc* oncogene amplification frequency of 35% was observed in a population with invasive ductal carcinoma in breast cancer patients (Figure 1). Similarly Blancato et al, (2004)<sup>24</sup> who studied the correlation between amplification and overexpression of *c-myc* in breast cancer reported a similar high frequency (30%). Aulmann et al, (2006)<sup>55</sup> found a frequency of 22% in their study while Deming et al, (2000)<sup>34</sup> found 15.7%. Differently, Yasojma et al, (2011)<sup>29</sup> observed positivity for 40%, which suggests that there is not an evident pattern concerning *c-myc* gene amplification in breast carcinoma patients.



**Figure 01:** Presence of *c-myc* amplification (analyzed by Chromogenic *In Situ* Hybridization - CISH) and *c-myc* tissue expression (analyzed by Immunohistochemistry - IHC) in patients with Breast Invasive Ductal Carcinoma.

Table 2 shows the comparison between CISH and IHC. Our study revealed no correlation between age, size, histological grade and nuclear grade with the CISH results.

**Table 2:** Clinicopathological features of patients according to *c-myc* amplification (CISH) and C-MYC expression (IHC).

Variables	CISH			IHC		
	+	-	<i>p</i> *	+	-	<i>p</i> *
	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)	
<b>Age (years)</b>						
≤50	8(26,7%)	22(73,3%)	0,1760	22(73,3%)	8(26,7%)	0,7800
>50	13(43,3%)	17(56,7%)		24(80%)	6(20%)	
<b>size(cm)</b>						
≤ 5	13(33,3%)	26(66,7%)	0,7122	30(76,9%)	9(23,1%)	0,9490
>5	8(38,1%)	13(61,9%)		16(76,2%)	5(23,8%)	
<b>Grade histological</b>						
I/II	7(26,9%)	19(73,1%)	0,2514	19(73,1%)	7(26,9%)	0,5654
III	14(41,2%)	20(58,8%)		27(79,4%)	7(20,6%)	
<b>Status nodal</b>						
Positive	18(41,9%)	25(58,1%)	0,0764	36(83,7%)	7(16,3%)	<b>0,0399</b>
Negative	3(17,6%)	14(82,4%)		10(58,8%)	7(41,2%)	
<b>Grade nuclear</b>						
1 and 2	6(27,3%)	16(72,7%)	0,3397	18(81,8%)	4(18,2%)	0,4728
3	15(39,5%)	23(60,5%)		28(73,7%)	10(26,4%)	

\*Chi-square test.

Breast cancer is a disease that presents a heterogeneous clinic behavior.<sup>3</sup> In this context it is important to take account many parameters when the clinic-pathologic diagnosis is made: histological grade of differentiation, lymph node status, size of tumor etc. However, other characteristics should be evaluated. They are becoming in some cases the most important parameters to choose a therapeutics. These biomarkers can be surface antigens, mRNAs or copies of genes found in higher number.<sup>56</sup>

Table 3 shows the correlation between CISH and IHC *c-myc* results with the molecular subtypes of breast cancer. According to our CISH data, 21 patients were positive for *c-myc* amplification while 39 were negative (Table 3).

These results show no significant differences between *c-myc* amplification ( $p=0.3730$ ) and C-MYC protein expression  $p=0.1906$  respectively. Status amplification and protein expression of the CISH and IHC tests are shown in Figure 2.

**Tabela 3.** Comparison between Chromogenic *In Situ* Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry (IHC) in the detection of *c-myc* amplification and protein expression, respectively, among the molecular subtypes of breast cancer.

Subtypes	CISH		<i>p</i> *	IHC		<i>p</i> *
	+	-		+	-	
LA	7(31,8%)	15(68,2%)	0,3730	14(63,6%)	8 (36,4%)	0,1906
LB	4(66,7%)	2 (33,3%)		5 (83,3%)	1 (16,7%)	
HER-2	2(25,0%)	6 (75,0%)		8 (100%)	0	
TN	8 (33,3%)	16 (66,7%)		19(79,2%)	5 (20,8%)	

LA: Luminal A; LB: Luminal B, HER-2: overexpression HER-2, TN: triple negative. \*Test qui-square or Fisher's exact (statistical significant  $p \leq 0.05$ ).

### Immunohistochemistry results

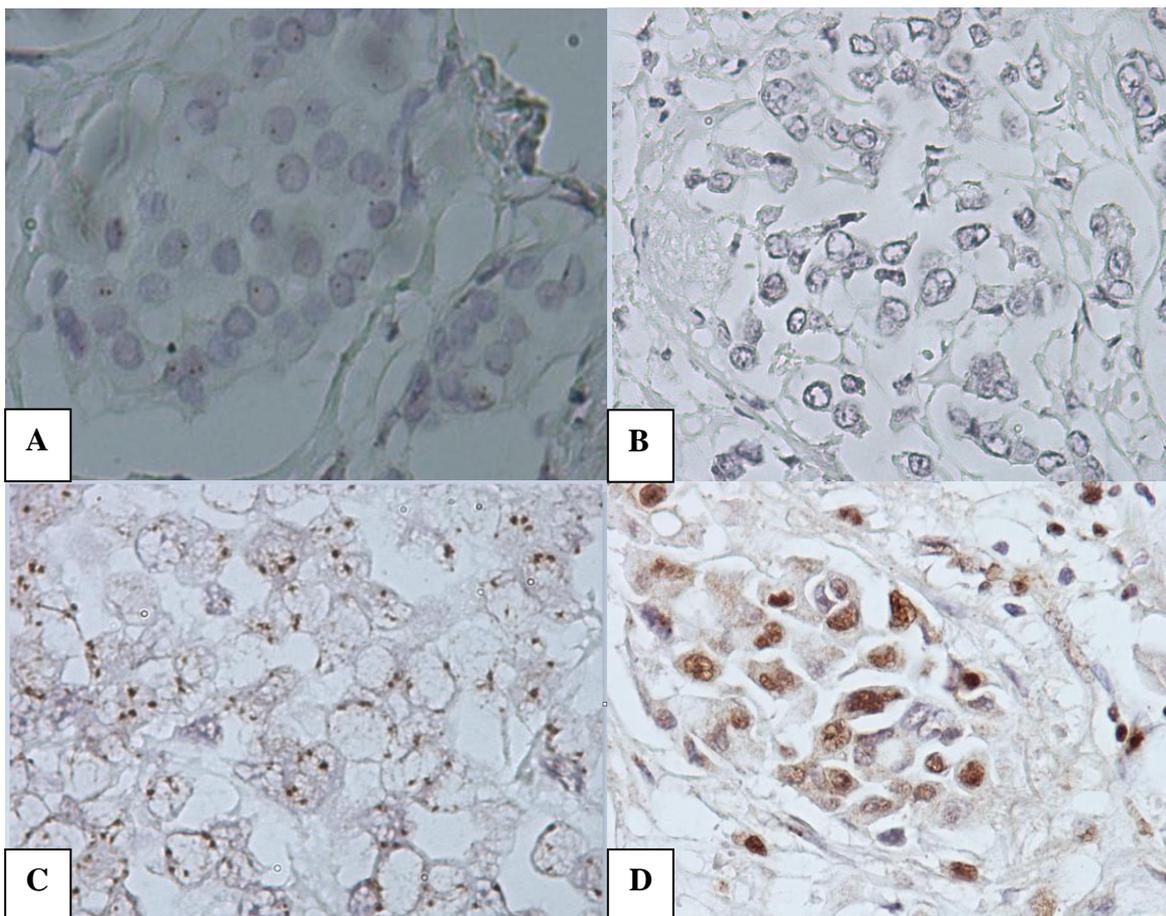
Table 2 shows the comparison between CISH and IHC. IHC positive and negative are show in Figure 2. Our study revealed no correlation between age, size, histological grade and nuclear grade with the C-MYC tissue expression. However, there is a statistically significant relationship between positive C-MYC protein expression and the presence of axillary lymph nodes metastasis ( $p=0.0399$ ). The nodal status is an important feature for prognosis<sup>51</sup> since the presence of metastasis to axillary lymph nodes occurs frequently in patients with breast cancer. Furthermore, the axillary dissection, while enabling removal of metastasis, provides also prognostic information and a better selection of adjuvant therapy.

C-MYC immunoreactivity was observed in 46 patients (76,7%) (Figure 1). Among this group, 17 patients were also positive for *c-myc* amplification. Ten samples had no amplification and were negative for IHC. Also, among 21 samples, 17 samples had positive signals for IHC and 4 samples had negative signals for IHC (Table 4).

**Tabela 4.** Comparison between Chromogenic *In Situ* Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry (IHC) in the detection of *c-myc* amplification in IDC breast cancer.

CISH IHC	Positive	Negative	Total
Positive	17(36.95%)	29(63.05%)	46
Negative	4(28.6%)	10(71.4%)	14
Total	21	39	60

The majority of patients with IHC negative (71.4%) had no amplification, but 29 patients with IHC positive had *c-myc* amplification (Table 4). There were four groups in our patients. The first group revealed both CISH+ and IHC+ (24%). The second revealed CISH+ and IHC- (32%). The third revealed CISH- and IHC+ (2%). The fourth group showed CISH- and IHC- (42%) (Table 4). Blancato et al, (2004)<sup>24</sup> who studied the correlation between amplification and overexpression of *c-myc* in breast cancer reported a similar high frequency (70%) in breast cancer Ismal et al (2009)<sup>26</sup> found a frequency of 73%, which suggests is the existence of an evident pattern concerning *c-myc* in breast carcinoma patients.



**Figure 02:** Chromogenic *in situ* hybridization (CISH) of *c-myc* amplification and Immunohistochemistry for C-MYC tissue expression. (a) *C-MYC* Non-amplified breast tumor (No amplification). (b) Breast cancer shows negative C-MYC IHC staining. (c) A typical *C-MYC* amplification appears as a positive cluster of gene copies in breast cancer. (d) Breast cancer shows positive C-MYC IHC staining (magnification,  $\times 400$ ).

Table 3 shows the correlation between *c-myc* amplification and C-MYC tissue expression with the different molecular subtypes of breast cancer. According to our IHC data, HER-2 and TN subtypes showed C-MYC immunoreactivity in 100% and 79.2% of the cases, respectively. Study conducted in Brazil showed a C-MYC positive pattern in 66.7 % of the invasive tumors<sup>57</sup>. High frequency of *c-myc* immunostaining in HER-2 and TN tumors can be related to the presence of poor clinicopathological characteristics prognosis.

These tumors have shorter disease-free survival rates when compared to luminal tumors. In this study, were most negative for *c-myc*. A recent study showed the best prognostic characteristics between the luminal alterations.<sup>50</sup> Reinforcing this thought, Murria et al, (2015)<sup>58</sup> showed that changes in *c-myc* (number of copies and increase of protein expression) were more frequent in non-luminal tumors.<sup>58</sup>

Table 2 shows the comparison between CISH and IHC. This result revealed that there is a significant difference between nodal *Status* and the C-MYC tissue expression. Studies report that *c-myc* positivity leads to a more aggressive and proliferative tumor and with greater capacity of metastasis. The levels of *c-myc* are strictly regulated. However, when *c-myc* is amplified tumors present a higher number of genes copies, which leads to the accumulation of this transcription factor. That signature more proliferative tumors. May influence the invasion nodal and production of metastasis<sup>26,50,58</sup>

## **CONCLUSION**

These findings may indicate that a light increase in the protein expression and number of copies of *c-myc* contribute to increased tumor aggressiveness. More studies are required to better understand the relevance of this information for the patients.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## REFERENCES

1. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
2. GLOBOCAN 2016 (IARC) Section of Cancer Information, acesso em 25 de Jan. de 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.
3. Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde, 2016. Estimativas da incidência de câncer no Brasil 2016. Rio de Janeiro:INCA.
4. Schulz WA. Breast Cancer. In: SCHULZ, WA. *Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook*. Netherlands: Springer, 2007. p. 357-382.
5. Haas JS, Phillips KA, Liang SY, Hassett MJ, Keohane C, Elkin EB, et al. Genomic testing and therapies for breast cancer in clinical practice. *Am J Manag Care* 2011;17:e174-81.
6. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 2011;16 Suppl 1:61-70.
7. Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21:177-84.
8. Kaltz-Wittmer C, Klenk U, Glaessgen A, Aust DE, Diebold J, Löhns U, et al. FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. *Lab Invest* 2000; 80:1455-64.
9. Lambros MB, Simpson PT, Jones C, Natrajan R, Westbury C, Steele D, et al. Unlocking pathology archives for molecular genetic studies: a reliable method to generate probes for chromogenic and fluorescent in situ hybridization. *Lab Invest* 2006; 86:398-408.
10. Sato H, Minei S, Hachiya T, Yoshida T, Takimoto Y. Fluorescence in situ hybridization analysis of c-myc amplification in stage TNM prostate cancer in Japanese patients. *Int J Urol* 2006;13:761-6.
11. Hansel DE, Swain E, Dreicer R, Tubbs RR. HER2 overexpression and amplification in urothelial carcinoma of the bladder is associated with MYC coamplification in a subset of cases. *Am J Clin Pathol* 2008;130:274-81.
12. Peng CH, Liao CT, Peng SC, Chen YJ, Cheng AJ, Juang JL, et al. A novel molecular signature identified by systems genetics approach predicts prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2011;6:e23452.
13. Rummukainen JK, Salminen T, Lundin J, Joensuu H, Isola JJ, et al., Amplification of c-myc oncogene by chromogenic and fluorescence *in*

*situ* hybridization in archival breast cancer tissue array samples. *Lab Invest* 2001;81:1545–1551.b

14.Letessier A, Sircoulomb F, Ginestier C, Cervera N, Monville F, Gelsi-Boyer V, et al. Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers. *BMC Cancer* 2006;6:245.

15.Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, et al. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol* 1999;187:396-402.

16.Cingoz S, Altungoz O, Canda T, Saydam S, Aksakoglu G, Sakizli M. DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization and their association with clinicopathologic parameters in breast tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;145:108-14

17.Choschzick M, Lassen P, Lebeau A, Marx AH, Terracciano L, Heilenkötter U, et al. Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. *Mod Pathol* 2010;23:603-10.

18.Myllykangas S, Böhling T, Knuutila S. Specificity, selection and significance of gene amplifications in cancer. *Semin Cancer Biol* 2007; 17:42-55.

19.Varmus HE. The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu Rev Genet* 1984;18:553-612.

20.Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spyrtos F, Champeme MH, Gest J, et al. Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:4834-8.

21.Bizari L, Silva AE, Tajara EH. Gene amplification in carcinogenesis. *Genet Mol Biol* 2006;29:1-7.

22. Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16:318-30.

23.Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with myc. *Nature* 2008;8:976-990.

24.Blancato J, Singh B, Liu A, Liao DJ, Dickson RB. Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer* 2004;90:1612–1619.

25.Rodriguez-Pinilla SM, Jones RL, Lambros MBK, Arriola E, Savage K, James M, et al. MYC amplification in breast cancer: a chromogenic *in situ* hybridisation study. *J Clin Pathol* 2007;60:1017–1023.

26. Ismail MF, Aly MS, Khaled HM, Mohamed HM. Detection of HER-2/neu, c-myc amplification and p53 inactivation by FISH in Egyptian patients with breast cancer. *German Medical Science* 2009;7:1-9.
27. Korshunov A, Remke M, Werft W, Benner A, Ryzhova M, Witt H, et al. Adult and pediatric medulloblastomas are genetically distinct and require different algorithms for molecular risk stratification. *J Clin Oncol* 2010;28:p.3054-60.
28. Todorović-Raković N, Nešković-Konstantinović Z, Nikolić-Vukosavljević D. C-myc as a predictive marker for chemotherapy in metastatic breast cancer. *Clin Exp Med* 2011.
29. Yasojima H, Shimomura A, Naoi Y, Kishi K, Baba Y, Shimazu K, et al. Association between c-myc amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Cancer* 2011;47:1779-88.
30. Ribeiro HF, Alcântara DF, Matos LA, Sousa JM, Leal MF, Smith MA, et al. Cytogenetic characterization and evaluation of c-MYC gene amplification in PG100, a new Brazilian gastric cancer cell line. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43:717-21.
31. Zitterbart K, Filkova H, Tomasikova L, Necesalova E, Zambo I, Kantorova D, et al. Low-level copy number changes of MYC genes have a prognostic impact in medulloblastoma. *J Neurooncol.* 2011;102:25-33.
32. Liao DJ, Dickson R. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2000;7:143–164.
33. Baryte-Lovejoy D, Lau SK, Boutros PC, Khosravi F, Jurisica I, Andrulis IL, et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res* 2006;66:5330–5337.
34. Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock B. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *British Journal of Cancer* 2000;83:1688-1695.
35. Leyland-Jones B. Trastuzumab: hopes and realities. *The Lancet Oncol* 2002;3:137–144
36. Jahanzeb M. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2008; 8:324-33.
37. Singer CF, Köstler WJ, Hudelist G. Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: current standards and future strategies. *Biochim Biophys Acta* 2008 ;1786:105-13.
38. Wolfer A, Wittner BS, Irimia D, Flavin RJ, Lupien M, Gunawardane, RN, et al. MYC regulation of a "poor-prognosis" metastatic cancer cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 107:3698-703.

39. Bouchalova K, Cizkova M, Cwierka K, Trojanec R, Hajduch M. Triple negative breast cancer- current status and prospective targeted treatment based on HER1 (EGFR), TOP2A and C-MYC gene assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2009;153:13-7.
40. Khaleghian M, Jahanzad I, Shakoori A, Ardalan FA, Azimi C. Study of C-MYC amplification and expression in Iranian gastric cancer samples using CISH and IHC methods. *Adv Biomed Res* 2015;4:116.
41. HAMMOND, M.E.H et al. ASCO-CAP Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v 28, n.16,p2784-2795,2010.
42. WOLFF, A.C et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. v.31, n.31, p. 3997-4013, 2013.
44. GOLDBIRSCHE, A et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*. v.24, n.9 , p. 2206-2223, 2013.
45. TODOROVIC´-RAKOVIC´, N.; NESKOVIC´-KONSTANTINOVIC´, Z.; NIKOLIC´-VUKOSAVLJEVIC, D. C-myc as a predictive marker for chemotherapy in metastatic breast cancer. *Clin Exp Med*. v.12, p, 217-223, 2012.
46. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295(21):2492-502.
47. Kwan ML, Kushi LH, Weltzien E, Maring B, Kutner SE, Fulton RS et al. Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res*. 2009;11(3):R31
48. Correa PB, Toralles MBP, Abe-Sandes K, Machado TMB, Bonfim TM. Cancer de mama triplo negativo e sua associacao com ancestralidade africana. *Rev Ci Med Biol*. 2010;9(Supl1):3-7.
49. INIC, Z et al, Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clinical Medicine Insights: Oncology*.v.8,p. 107-111, 2014.
50. Kim, H et al. Biologic subtype is a more important prognostic factor than nodal involvement in patients with stages I and II breast carcinoma. *Annals of Surgical Treatment and Research*. v,90,n,1. p,1-9, 2016.
51. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on cancer: the 7<sup>th</sup> edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471-74.

52. Abreu E, Kioifman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Rev Bras Cancerol* 2002;48:113-31.

53. Yoder BJ, Wilkinson EJ, Massol NA. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. *The Breast Journal* 2007;13:172-179.

54. Lambros MB, Natrajan R, Reis-Filho JS. Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer. *Hum Pathol* 2007;38:1105-22.

55. Aulmann S, Adler N, Rom J, Helmchen B, Schirmacher P, Sinn H P. c-myc amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences. *J Clin Pathol* 2006;59:424–428.

56. Hamilton A, Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2. *Ann Oncol* 2000;11:647-63.

57. MAZZINI, R.C et al. Prevalence of c-myc expression in breast lesions associated with microcalcifications detected by routine mammography. *Sao Paulo Med J.* v.127. n,2 , p.66-70,2009.

58. MURRIA, R et al. Immunohistochemical, genetic and epigenetic profiles of hereditary and triple negative breast cancers. Relevance in personalized medicine. *Am J Cancer Res.*v.5,n.7, p. 2330-2343, 2015.

## 6 CONCLUSÕES

- Os subtipos moleculares mais prevalentes na população estudada foram luminal B e triplo negativo;
- Tumores luminais, notadamente luminal A, apresentaram características clínico-patológicas significativamente favoráveis, exibindo tumores diferenciados, com baixo a moderado graus histológico e nuclear ao diagnóstico.
- Tumores superexpressão de HER-2 e triplo-negativos indicaram prognósticos desfavoráveis. Foram observadas maior positividade para invasão de linfonodos regionais, maiores chances de tumores indiferenciados e um predomínio de diagnóstico entre as pacientes mais jovens, respectivamente;
- Entre os pacientes com amplificação do gene *c-myc* não foi verificada uma associação estatisticamente significante com relação aos subtipos moleculares de câncer de mama. Contudo, maior frequência de amplificação foi observada nos tumores triplo-negativos.
- A positividade de expressão protéica para C-myc foi associada à presença de metastases em linfonodos resgionais entre os pacientes

## REFERÊNCIAS

ABD EL-REHIM, Dalia M. et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. **The Journal of pathology**, v. 203, n. 2, p. 661-671, 2004.

ABREU, Evaldo; KOIFMAN, Sérgio. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113-31, 2002.

ALESKANDARANY, Mohammed A. et al. Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive, and triple-negative biologic classes of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 1, p. R3, 2012.

American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2015*. **Atlanta: American Cancer Society**, 2015.

American cancer society: Cancer facts and figures. **Atlanta: American Cancer Society**, 2014.

American cancer society: Cancer facts and figures. **Atlanta: American Cancer Society**, 2016.

BADVE, Sunil; NAKSHATRI, Harikrishna. Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications. **Journal of clinical pathology**, v. 62, n. 1, p. 6-12, 2009.

BARSYTE-LOVEJOY, Dalia et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. **Cancer research**, v. 66, n. 10, p. 5330-5337, 2006.

BERTUCCI, F.; CERVERA, N.; BIRNBAUM, D. A gene signature in breast cancer. **N Engl J Med**. v. 356, n. 18, p. 1887-8, 2007.

BERTUCCI, F.; FINETTI, P.; BIRNBAUM, D. Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. **Current molecular medicine**, v. 12, n. 1, p. 96-110, 2012.

BERTUCCI, François et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 20, p. 2981-2991, 2000.

BERTUCCI, François; BIRNBAUM, Daniel; GONCALVES, Anthony. Proteomics of breast cancer principles and potential clinical applications. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 1772-1786, 2006.

BHARGAVA, Rohit et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 2, n. 5, p. 444-455, 2009.

- BIZARI, L.; SILVA, A. E.; TAJARA, E. H. Gene amplication carsinogenesis. **Genetics and Molecular Biology**, v.7, n.1, p.1-7, 2006.
- BLOWS, Fiona M. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS Med**, v. 7, n. 5, p. e1000279, 2010.
- BOUCHALOVA, K. et al. Triple Negative Breast Cancer-Current Status and Prospective Target Treatment Based on HER1(EGFR), POP2A, and c-myc Gene Assessment. **Biomed Pap Med**, v.153, n.1, p.13-18, 2009.
- BOXER, L.M.; DANG, C.V. Translocations involving c-myc and c-myc function. **Oncogene**. v.20, n.40, p.5595-610, 2001.
- BUERGER, Horst et al. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast evidence of multiple genetic pathways. **The Journal of pathology**, v. 187, n. 4, p. 396-402, 1999.
- BURSTEIN, Harold J. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. **New England Journal of Medicine**. v. 353, n. 16, p. 1652-1654, 2005.
- CALDARELLA, Adele et al. Female breast cancer status according to ER, PR and HER2 expression: a population based analysis. **Pathology & Oncology Research**, v. 17, n. 3, p. 753-758, 2011.
- CHAGAS, C. R. et al. Tratado de Mastologia da SBM. **Rio de Janeiro: Revinter**, p. 764-5, 2011.
- CHANG, Howard Y. et al. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. **PLoS Biol**, v. 2, n. 2, p. e7, 2004.
- CHEANG, Maggie CU et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1368-1376, 2008.
- CHOI, Yoon-La et al. Triple-negative, basal-like, and quintuple-negative breast cancers: better prediction model for survival. **BMC cancer**, v. 10, n. 1, p. 507, 2010.
- CHOSCHZICK, Matthias et al. Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. **Modern pathology**, v. 23, n. 4, p. 603-610, 2010.
- CINGOZ, Sultan et al. DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization and their association with clinicopathologic parameters in breast tumors. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 145, n. 2, p. 108-114, 2003.

CONNOLLY, James L. Changes and problematic areas in interpretation of the AJCC Cancer Staging Manual, for breast cancer. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 130, n. 3, p. 287-291, 2006.

COURJAL, Frank; THEILLET, Charles. Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. **Cancer research**, v. 57, n. 19, p. 4368-4377, 1997.

DABBS, D. J. **Breast Pathology**. 1 ed. New York: Elsevier Saunders, 2012. 800 p.

DALLA-FAVERA, Riccardo et al. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 24, p. 7824-7827, 1982.

DAWOOD, Shaheenah et al. Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study. **Breast cancer research and treatment**, v. 126, n. 1, p. 185-192, 2011.

DEMING, S. L. et al. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. **British Journal of Cancer**, v. 83, n. 12, p. 1688, 2000.

ELSTON, C.W., ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with longterm follow-up. **Histopathology**, n.19, v.5, p. 403-10, 1991.

ESCOT, Chantal et al. Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 13, p. 4834-4838, 1986.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.52, n.2, p.165-171, 2006.

FITZGIBBONS, Patrick L. et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists consensus statement 1999. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 124, n. 7, p. 966-978, 2000.

GEYER, Felipe C. et al. Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers. **Advances in anatomic pathology**, v. 19, n. 1, p. 39-53, 2012.

GLOBOCAN 2016 (IARC) Section of Cancer Information, acesso em 25 de Jan. de 2016. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.

GOLDHIRSCH, A. 2011 et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology**, p. mdr304, 2011.

- GOWN, Allen M. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. **Modern Pathology**, v. 21, p. S8-S15, 2008.
- GRANDORI, Carla et al. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 16, n. 1, p. 653-699, 2000.
- GUIU, S. et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 12, p. 2997-3006, 2012.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v.144, n.5, p.646-74, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v.100, n.1, p.57-70, 2000.
- HERSCHKOWITZ, Jason I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome biology**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007.
- IRIGOYEN, M. A. et al. Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics. In: **Anales del sistema sanitario de Navarra**. 2010. p. 219-233.
- ISMAIL, Manal F. et al. Detection of HER-2/neu, c-myc amplification and p53 inactivation by FISH in Egyptian patients with breast cancer. **GMS German Medical Science**, v. 7, 2009.
- JAHANZEB, M. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer. **Clin Breast Cancer**. v.8, n.4, p.324-33, 2008.
- KALTZ-WITTMER, C. et al. FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1 ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. **Lab Invest**. v.80, n.9, p.1455-64, 2000.
- KIM, Mi-Jung et al. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. **Human pathology**, v. 37, n. 9, p. 1217-1226, 2006.
- KORSHUNOV, A. et al. Adult and pediatric medulloblastomas are genetically distinct and require different algorithms for molecular risk stratification. **J Clin Oncol**. v.28, n.18, p.3054-60, 2010.
- KOSCIELNY, S. et al. Impact of tumour size on axillary involvement and distant dissemination in breast cancer. **British journal of cancer**, v. 101, n. 6, p. 902-907, 2009.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2009.

LAKHANI, Sunil R. et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 14, p. 5175-5180, 2005.

LAL, Priti; TAN, Lee K.; CHEN, Beiyun. Correlation of HER-2 status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinomas. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 123, n. 4, p. 541-546, 2005.

LAMBROS, Maryou BK et al. Unlocking pathology archives for molecular genetic studies: a reliable method to generate probes for chromogenic and fluorescent in situ hybridization. **Laboratory investigation**, v. 86, n. 4, p. 398-408, 2006.

LEONG, A.S.; LEONG, T.Y. Standardization in immunohistology. **Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues: Methods and Protocols**, v. 724, p. 37-68, 2011.

LETESSIER, Anne et al. Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers. **BMC cancer**, v. 6, n. 1, p. 245, 2006.

LEYLAND-JONES, B. Trastuzumab: hopes and realities. **The Lanc Oncol.** v.3, n.3, p.137-144, 2002.

LIAO, D.J.; DICKSON, R.B. c-Myc in breast cancer. **Endocrine Related Cancer**, v.7, n.3, p.143-164, 2000.

LU, X.; PEARSON, A.; LUNEC, J. The MYCN oncoprotein as a drug development target. **Cancer Letters**. v.197, n.1-2, p.125-130, 2003.

MACKAY, Alan et al. Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 8, p. 662-673, 2011.

MATOS, Irina et al. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Archiv**, v. 447, n. 4, p. 688-694, 2005.

MENKE, C.H. **Rotinas em Mastologia**. 2 ed. Brasil: Artmed, 2007.270p.

MEYER, N.; PENN, L.Z. Reflecting on 25 years with myc. **Nature**, v.8, p.976-990, 2008.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

MUNJAL, Kavita et al. Immunohistochemical analysis of ER, PR, Her2 and CK5/6 in infiltrative breast carcinomas in Indian patients. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 10, n. 5, p. 773-778, 2009.

NIELSEN, Torsten O. et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor–positive breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 21, p. 5222-5232, 2010.

NOFECH-MOZES, Sharon et al. Systematic review on hormone receptor testing in breast cancer. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 20, n. 3, p. 214-263, 2012.

PARKER, Joel S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of clinical oncology**. v. 27, n. 8, p. 1160-1167, 2009.

PAYNE, S. J. L. et al. Predictive markers in breast cancer the present. **Histopathology**. v. 52, n. 1, p. 82-90, 2008.

PENG, Chien-Hua et al. A novel molecular signature identified by systems genetics approach predicts prognosis in oral squamous cell carcinoma. **PLoS one**. v. 6, n. 8, p. e23452, 2011.

PINTO, A. E. et al. C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (ER+) breast cancer patients with poor prognosis. **Annals of oncology**, v. 12, n. 4, p. 525-533, 2001.

PODSYPANINA, K. et al. Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. **Science**. v.321, n.5897, p.1841-4, 2008.

PRAT, Aleix et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast cancer research**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.

RAKHA, E. A. et al. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. v.113, n.3, p.411-22, Feb. 2009.

RAKHA, E.A.; REIS-FILHO, J. Basal-like breast carcinoma: from expression profiling to routine practice. **Arch Pathol Lab Med**. v.133, n.6, p.860-68, 2009.

RAKHA, E.A; ELLIS, I.O. Triple-negative/basal like breast cancer: review. **Pathology**.v.41, n.1, p.40-7, 2009.

RAKHA, Emad A. et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor–positive phenotype. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 30, p. 4772-4778, 2007.

RAKHA, Emad A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 207, 2010.

REIS-FILHO, J.S, TUTT, A.N.J. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**. v.52, n.1, p.108-18, Jan. 2008.

REIS-FILHO, Jorge S. et al. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. R1028, 2005.

RIBEIRO, H.F et al. Cytogenetic characterization and evaluation of c-MYC gene amplification in PG100, a new Brazilian gastric cancer cell line. **Braz J Med Biol Res.** v.43, n.8, p.717-21, 2010.

ROSEN, P.P. **Rosen's Breast Pathology**. 3 ed. New York: Lippincott Williams's e Wilkins, 2009. 1116 p.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, F.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Rubin's Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUMMUKAINEN, J.K et al. Amplification of c-myc oncogene by chromogenic and fluorescence in situ hybridization in archival breast cancer tissue array samples. **Lab Invest.**v.81, n.11, p.1545-51, 2001.

SCHMITT, F.CL.; GOBBI, H. Mama. In: BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 18, p. 651-681.

SCHULZ, W. A. **Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook**. Springer, 2007.

SINGER, C.F.; KÖSTLER, W.J.; HUDELIST, G. Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: current standards and future strategies. **Biochim Biophys Acta**. v.1786, n.2, p.105-13, 2008.

SINGLETARY, S. Eva et al. Staging system for breast cancer: revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. **Surgical Clinics**, v. 83, n. 4, p. 803-819, 2003.

SØRLIE, Therese et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SØRLIE, Therese et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, 2003.

SOUCEK, Laura et al. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 679-683, 2008.

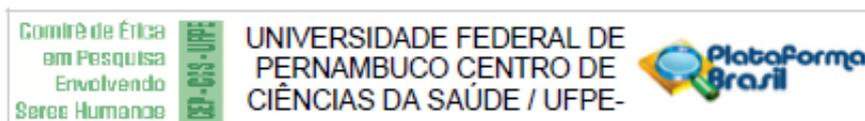
TANSEY, William P. Mammalian MYC proteins and cancer. **New Journal of Science**, v. 2014, 2014.

TIRKKONEN, Mika et al. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 21, n. 3, p. 177-184, 1998.

- TODOROVIĆ-RAKOVIĆ, Nataša; NEŠKOVIĆ-KONSTANTINOVIĆ, Zora; NIKOLIĆ-VUKOSAVLJEVIĆ, Dragica. C-myc as a predictive marker for chemotherapy in metastatic breast cancer. **Clinical and experimental medicine**, v. 12, n. 4, p. 217-223, 2012.
- TRIMBOLI, Anthony J. et al. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. **Cancer research**, v. 68, n. 3, p. 937-945, 2008.
- VITA, M.; HENRIKSSON, M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. **Semin Cancer Biol.** v.16, n.4, p.318-30, 2006.
- WANG, Yixin et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. **The Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 671-679, 2005.
- WEBSTER, Lucy R. et al. Poor-prognosis estrogen receptor–positive breast cancer identified by histopathologic subclassification. **Clinical cancer research**, v. 14, n. 20, p. 6625-6633, 2008.
- WELM, Alana L. et al. MET and MYC cooperate in mammary tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 12, p. 4324-4329, 2005.
- WHO <http://www.who.int/en/aceso> em 20 de Set. de 2015.
- WOLFER, Anita et al. MYC regulation of a “poor-prognosis” metastatic cancer cell state. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 8, p. 3698-3703, 2010.
- XU, J.; CHEN, Y.; OLOPADE, O.I. MYC and Breast Cancer. **Genes & Cancer**. v.1, n.6, p.629-640, 2010.
- YASOJIMA, Hiroyuki et al. Association between c-myc amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 12, p. 1779-1788, 2011.
- ZAJAC-KAYE, M. Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. **Lung Cancer**, v.34, p.S43-S46, 2001.
- ZITTERBART, Karel et al. Low-level copy number changes of MYC genes have a prognostic impact in medulloblastoma. **Journal of neuro-oncology**, v. 102, n. 1, p. 25-33, 2011.

## ANEXO

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE USO POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MAMÁRIAS E PROSTÁTICAS HUMANAS.

**Pesquisador:** Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

**Área Temática:**

**Versão:** 6

**CAAE:** 06586612.9.0000.5208

**Instituição Proponente:** LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

**Patrocinador Principal:** CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

##### DADOS DO PARECER

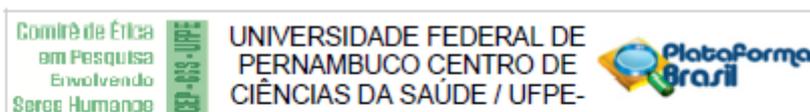
**Número do Parecer:** 672.083

**Data da Relatoria:** 09/06/2014

##### Apresentação do Projeto:

Verifica-se que, na carcinogênese, ocorrem mudanças na expressão de proteínas celulares que levam a alterações nas vias de sinalização induzindo, freqüentemente, mudanças no microambiente tumoral, causando inflamação e resultando em mudança no perfil das proteínas teciduais que podem ser secretadas (Kopf & Zharhary, 2007). O grau de malignidade do câncer está relacionado à sua habilidade em desarranjar a arquitetura tecidual, invadir fronteiras de tecidos adjacentes e metastizar para órgãos distantes. Em termos simples, o câncer é uma doença de desenvolvimento resultante da perda dos controles normais que conduzem as células para acumular-se nos tecidos e que as matem dentro dos limites dos seus órgãos (De Melja et al., 2003). O padrão de glicosilação de proteínas de tecidos pode ser influenciado por diversas mudanças fisiológicas, tais como papéis em diversos processos biológicos como, sinalização celular, reconhecimento imunológico, metástase, diferenciação celular entre outros (Ambrosi et al., 2005; Rosenfeld et al., 2007). Lectinas, proteínas ligadoras de carboidratos e de distribuição ublqua na natureza, possuem a

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 672.063

capacidade de agir como moléculas de reconhecimento dentro de células e na superfície celular (Geimelner et al, 2008).

**Objetivo da Pesquisa:**

1) Identificar novos biomarcadores de uso potencial no diagnóstico e prognóstico de alterações mamárias e prostáticas humanas utilizando sondas

tradicionais e inovadoras;

2) Objetivo Secundário:

- Obter amostras clínicas (tecido e sangue) de pacientes submetidos a cirurgias realizadas nos setores de Urologia e Mastologia do Hospital das

Clinicas de Pernambuco  $\zeta$  UFPE; - Obter blocos de tecidos mamários e prostáticos embebidos em parafina pertencentes ao setor de Anatomia

Patológica do Hospital das Clínicas de Pernambuco  $\zeta$  UFPE; -

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e benefícios citados estão adequados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Verifica-se que, o Grupo Biomarcadores no Câncer (BmC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) tem

empregado a histoquímica com lectinas, imunohistoquímica e biologia molecular para avaliar o perfil fenotípico e genotípico de carboidratos em

glicconjugados de superfície celular e a expressão de glicosiltransferases em tecidos humanos normais e transformados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos apresentados estão adequados.

**Recomendações:**

S/Recomendação;

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

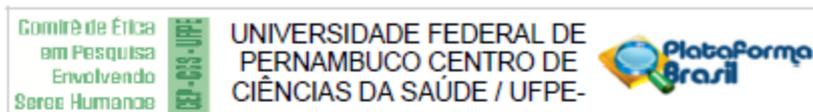
Aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 672.983

**Não**

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 03 de Junho de 2014

---

Assinado por:  
**GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO**  
 (Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br